

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Análises Clínicas

Hiperplasia das subpopulações de células de Kupffer associada ao hipertireoidismo experimental

Sandra Lorente

Tese para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes

São Paulo
2004

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ



30100007146

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L869h Lorente, Sandra
Hiperplasia das subpopulações de células de Kupffer associada
ao hipertireoidismo experimental / Sandra Lorente. -- São Paulo,
2004.
47p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Gomes, Lígia Ferreira

1. Patologia celular 2. Histoquímica I. T. II. Gomes,
Lígia Ferreira, orientador.

574.8765 CDD

Sandra Lorente

Hiperplasia das subpopulações de células de Kupffer associada ao hipertireoidismo experimental

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
orientador/presidente

Profa. Dra Silvia Berlanga de Moraes Barros

Dr. Celso di Loreto

São Paulo, 23 de março de 2004.

A Fé é um modo de possuir desde agora o que se espera, um meio de conhecer realidades que não se vêem. Foi ela que valeu aos ancestrais um bom testemunho.

Pela fé nós compreendemos que os mundos foram organizados pela palavra de Deus. Segue-se daí que o mundo visível não tem suas origens em aparências.

Hebreus 11: 1-3.

Agradecimentos

A Lígia Ferreira Gomes por ter me aceitado como aluna, por todos os ensinamentos, apoio e conselhos durante a minha trajetória nesta Universidade.

A Dra Virginia Berlanga Campos Junqueira pelos materiais cedidos, uso do laboratório e seminários.

A Karin Argenti Simon-Giavarrotti e a Leandro Giavarotti pela ajuda com os primeiros tratamentos, e pelo auxílio na utilização dos materiais e equipamentos do laboratório.

A Adhemar Longatto Filho, por todos ensinamentos e pelo incentivo à pesquisa e a todos os colegas do Instituto Adolfo Lutz, que me apoiaram desde o início.

A Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros pelos materiais e equipamentos utilizados no laboratório e pelas dicas.

A Dra. Edna Montero e seus alunos pelas técnicas de anestesia, cirurgia e coleta em animais.

A Adriano e Eduardo que me ajudaram com os cortes, no início do mestrado.

A Regina Catarino pela ajuda com as técnicas de congelamento e pelas dicas de imuno-histoquímica e a Ivonete, técnica de patologia da Unifesp, que me ajudou com cortes de congelamento.

Às minhas “irmãzinhas” de mestrado, Paula Regina Knox, Sheila Viera Cruz e Elisângela Monteiro Pereira, pelo auxílio nos experimentos e nas disciplinas.

Aos amigos Tânia, Sonia, Clarissa, Vanessa, Cristina, César e Henrique pelo auxílio na utilização dos materiais e equipamentos do laboratório e pela amizade, conselhos e conversas.

À amiga Cristine Dobbo por todas as dicas e conselhos que me deu durante a padronização das técnicas de imuno-histoquímica.

A Cristiane, Elenir, Marisa, Josimar, Marcelo, Carol, Mário e a todos os colegas do Delboni pelo apoio e incentivo que me dedicaram durante este período.

Às minhas melhores amigas Dina Carla, Natália Santos Gomes, Luciana de Oliveira Leandro, Luciana Luz Hardt, Maria Clorimar, Neuza Carla Fabro Freire, Adriana Póstuma, Daniela Etlinger, Kelly Cristina Lomonaco, Viviane Peixoto, Carla de Cillo, Margarida Santinho Jacobick e Rita Gonçalo Santos, por muitas vezes terem me ajudado nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Luciana e Marcus e aos meus cunhados Ibrahim e Cristina pelo apoio, incentivo e dedicação.

Aos meus tios Waldomiro, Paula e Annita e a toda minha família pelo incentivo, confiança e dedicação.

A meu pai e a minha mãe, por tudo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Células de Kupffer: função e interação com outras células do sinusóide hepático	1
1.2. Substâncias produzidas e secretadas pelas células de Kupffer ativadas	4
1.2.1. Moduladores de funções celulares	6
1.2.2. Mecanismos de defesa e citotoxicidade.....	8
1.2.3. Enzimas lisossomais e proteinases neutras	8
1.2.5. Outras substâncias	9
1.2.6. Sistema auto-regulatório da estimulação das células de Kupffer	9
1.2.7. Interação entre as células do fígado e os mediadores químicos.....	10
1.3. Desenvolvimento ontogenético das células de Kupffer.....	12
1.4. Diferenciação das células de Kupffer	13
1.5. Proliferação de macrófagos.....	14
1.6. Subpopulações de células de Kupffer	14

1.7. Efeitos de hormônio tireoideano sobre as células de Kupffer	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais:	19
3.2. Modelo Experimental:.....	19
3.3. Tratamento com T ₃ :.....	20
3.4. Tratamento com Cloreto de Gadolínio (GdCl ₃):	20
3.5. Procedimento cirúrgico:.....	20
3.6. Determinação da concentração plasmática de T ₃ :.....	21
3.7. Procedimento histológico:	22
3.8. Avaliação da captação de carbono coloidal:.....	22
3.9. Estudo das subpopulações de macrófagos:	24
3.10. Análise de Imagem:.....	25
3.11. Análise estatística dos resultados:	26
4. RESULTADOS.....	27
4.2. Avaliação da captação do carbono coloidal:.....	28
4.3. Avaliação Imuno-Histoquímica:	30
4.3.1. População de células ED1 positivas	32
4.3.2. População de células ED2 positivas.....	33

4.4.3. População estimada de células ED1+/ED2-	34
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

Lista de Figuras

- Figura 1** – Esquema da localização e das relações anatômicas das células de Kupffer no sinusóide hepático (DECKER, 1990). 1
- Figura 2** – Esquema da ativação da célula de Kupffer baseado em um modelo proposto por DECKER, 1990. 5
- Figura 3** – Mecanismo auto-regulatório da estimulação de células de Kupffer (DECKER, 1997). 10
- Figura 4** – Esquema das interações bioquímicas entre células de Kupffer, outras células hepáticas e polimorfonucleares neutrófilos durante a inflamação (DECKER, 1997). 11
- Figura 5** – Esquema da distribuição dos animais nos grupos experimentais. 19
- Figura 6** – Esquema do procedimento experimental: grupos de ensaios realizados. 21
- Figura 7** – Esquema da diálise do carbono coloidal. 23
- Figura 8** – Fotomicrografia representativa dos campos utilizados para a análise morfométrica da captação de carbono coloidal de animais tratados com: A) salina, B) T₃, C) GdCl₃, D) T₃ e GdCl₃. Aumento: 400x. As setas mostram a captação do carbono coloidal. 28
- Figura 9** – Fotomicrografia representativa da reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal ED1 em fígado de rato para animais tratados com A) salina, B) T₃, C) GdCl₃, D) T₃ e GdCl₃. Contracoloração: hematoxilina. Aumento: 200x. As setas indicam células de Kupffer com reação positiva para ED1. 30
- Figura 10** – Fotomicrografia representativa da reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal ED2 em fígado de rato para animais tratados com A) salina, B) T₃, C) GdCl₃, D) T₃ e GdCl₃. Contracoloração: hematoxilina. Aumento: 200x. As setas indicam células de Kupffer com reação positiva para ED2. 31
- Figura 11** – Densidade celular (células/mm²) da subpopulação ED1 nos grupos controle e tratados com T₃ nas zonas do lóbulo hepático (I, II, III) ▲:

animais tratados com T_3 . ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com $GdCl_3$ em cada grupo. *Diferenças estatísticas entre os grupos controles e hipertireoídeos foram analisados com ANOVA para medidas repetidas, seguido de estabilização de variância por Box-Cox, $\lambda = 1/4$, $p < 0.05$ 32

Figura 12 – Densidade celular (células/ mm^2) da subpopulação ED2 nos grupos controle e tratados com T_3 nas zonas I, II, III do lóbulo hepático. ▲: animais tratados com T_3 . ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com $GdCl_3$ em cada grupo. 33

Figura 13 – Densidade celular (células/ mm^2) da subpopulação estimada de células ED1+/ED2- nos grupos controle e tratados com T_3 nas zonas do lóbulo hepático (I, II, III) ▲: animais tratados com T_3 . ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com $GdCl_3$ em cada grupo. *Diferenças estatísticas entre os grupos controles e hipertireoídeos foram analisados com ANOVA para medidas repetidas, seguido de estabilização de variância por Box-Cox, $\lambda = 1/4$, $p < 0.05$ 34

Lista de Tabelas

- Tabela I** – Concentração plasmática de T_3 (ng/mL)^a, segundo a condição de tratamento dos animais^b 27
- Tabela II** – Captação de carbono coloidal pelas células de Kupffer^a, segundo a condição de tratamento dos animais^b 29

Abreviaturas

AMP _c	AMP cíclico, adenosina 3',5'-monofosfato
AP-1	Ativador de proteína 1
Ca ²⁺	Cátion cálcio
CFU-GM	Unidades formadora de colônia de granulócitos e monócitos
CFU-M	Unidade formadora de colônia de monócitos
CFU-S	Unidade formadora de colônia de célula pluripotente ("Stem cell")
CSF-GM	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
CSF-M	Fator estimulador de colônia de macrófagos
ET-1	Endotelina-1
GdCl ₃	Cloreto de Gadolínio
GSH	Glutathiona reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HO·	Radical Hidroxila
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
LPS	Lipopolissacarídeos
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
M-CFC	Célula formadora de colônia de macrófagos
NADPH	Dinucleotídeo adenina nicotinamida reduzido
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO·	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion radical superóxido
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGF _{2α}	Prostaglandina PGF _{2α}
PGD ₂	Prostaglandina D ₂

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
FMA	Forbol 12 myristato 13 acetato
T ₃	3,3',5-L-triiodotironina
TGF- α	Fator de crescimento transformante- α
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TXA ₂	Tromboxano A ₂

RESUMO

O hipertireoidismo associa-se ao estresse oxidativo hepático, demonstrando-se aumentos no metabolismo basal e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos hepatócitos, enquanto são comprometidos os principais sistemas antioxidantes do tecido hepático. Macrófagos contribuem para o estresse oxidativo observado em animais tratados com triiodotironina (T_3), sendo descritas a hiperplasia e a hipertrofia das células de Kupffer, que são um grupo heterogêneo de células, derivado de uma população menos numerosa de precursores locais, pouco distintos, morfológicamente, dos elementos maduros da linhagem. O próprio ambiente sinusoidal estimula a proliferação e a diferenciação de precursores em células de Kupffer, mas aumentos na velocidade de renovação celular podem implicar efeitos funcionais secundários. Para investigar se células mononucleares circulantes, derivadas da medula óssea, participam na patogênese da hiperplasia das células de Kupffer, o hipertireoidismo funcional foi induzido em ratos Sprague-Dawley, tratados com T_3 (0,1mg/kg, 3 dias i.p.). Nos animais controle, foi administrado volume equivalente de solução salina. Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$ 10 mg/kg e.v.) foi utilizado para eliminar células de Kupffer, produzindo controles negativos adicionais em cada grupo. Subpopulações de células de Kupffer foram caracterizadas por imuno-histoquímica, em tecido hepático fixado em metacam e incluído em parafina, pela reação com anticorpos monoclonais ED1 e ED2. A fagocitose foi demonstrada por análise morfométrica de cortes contracorados com vermelho neutro nuclear em animais administrados com carbono coloidal (640 mg/kg, i.v.). Foi observado um aumento significativo na área marcada pelo carbono coloidal nos animais tratados com T_3 , efeito que foi abolido pela administração de $GdCl_3$. Anticorpos ED1 e ED2 forneceram evidências de que a hiperplasia das células de Kupffer induzida por T_3 leva a uma mudança na população de macrófagos, com aumento de células fenotipicamente mais jovens (ED1+/ED2-). Assim a hiperplasia das células de Kupffer induzida por T_3 envolve tanto a expansão de precursores locais pelo recrutamento de monócitos circulantes, como a sua diferenciação em células de Kupffer maduras.

ABSTRACT

There is a general relationship between hyperthyroidism and liver oxidative stress. Thyroid hormones increase both the basal metabolic rate and the production of oxygen and nitrogen reactive species in liver parenchymal cells, while compromise the main hepatic antioxidant systems. Liver macrophages contribute to the hepatic oxidative stress observed in triiodothyronine (T_3)-treated rats, and both Kupffer cell hyperplasia and hypertrophy are reported. Kupffer cells are a heterogeneous group of cells, derived from a less numerous population of local precursors, which are fairly morphologically distinguishable from the mature lineage elements. Sinusoidal environment itself stimulates proliferation and differentiation of macrophage precursors into Kupffer cells, but increased turnover rates modify the sinusoidal environment and may imply further functional effects. In order to investigate if the bone marrow derived, circulating mononuclear cells participate in the pathogenesis of Kupffer cell hyperplasia; Sprague-Dawley rats were treated with T_3 (0.1mg/kg, 3 days, i.p.) to induce functional hyperthyroidism. Normothyroid controls were administered saline. Gadolinium chloride ($GdCl_3$, 10 mg/kg) was employed to eliminate Kupffer cells, providing additional negative control animals in each group. Kupffer cell subpopulations were characterized by immunohistochemistry in metacarn fixed and paraffin included livers, after reaction with ED1 and ED2 monoclonal antibodies. Phagocytosis was demonstrated by morphometric analysis of stained areas in nuclear red counter-stained sections taken from animals administered colloidal carbon (640 mg/kg, i.v.). Colloidal carbon uptake was increased in the liver of animals treated with T_3 , an effect that was completely abolished by $GdCl_3$ administration. ED1 and ED2 antibodies provided evidence that T_3 -induced Kupffer cell hyperplasia causes a shift on liver macrophage population, leaning towards younger cell phenotypes (ED1+/ED2-). Thus, T_3 -induced Kupffer cell hyperplasia involves both the expansion of KC precursor population through circulating monocyte recruitment, and the differentiation of local precursors into mature liver macrophages.

1. Introdução

1.1. Células de Kupffer: função e interação com outras células do sinusóide hepático

As células de Kupffer são macrófagos especializados, encontrados no lúmen ou entre as células endoteliais fenestradas do sinusóide hepático (Figura 1). Estas células têm um importante papel na defesa do hospedeiro durante os processos de lesão e reparo (WINWOOD & ARTHUR, 1998). Elas representam a maior população de macrófagos do corpo, constituindo cerca de 10% do total de células hepáticas e 80% dos macrófagos teciduais (TAKEZAWA *et al.*, 1995). Sua posição anatômica e histológica está estrategicamente relacionada com o controle da variedade de substâncias presentes no sangue (BOUWENS *et al.*, 1992).

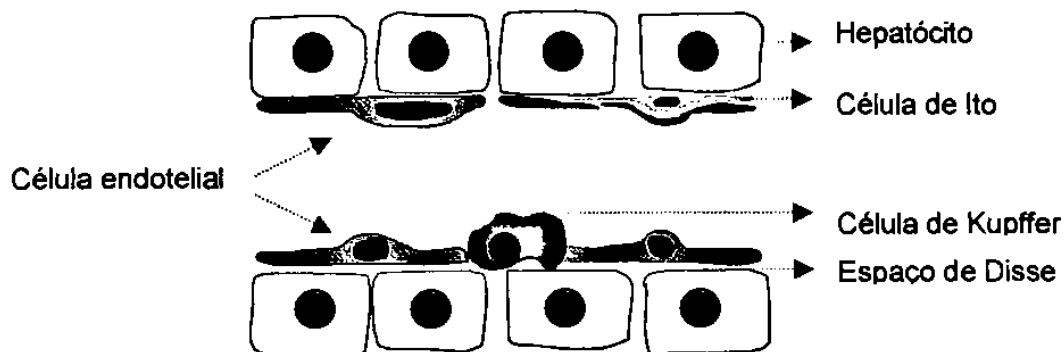


Figura 1 – Esquema da localização e das relações anatômicas das células de Kupffer no sinusóide hepático (DECKER, 1990).

As células de Kupffer apresentam uma forma variável, com muitos processos citoplasmáticos, alguns dos quais estendem-se até o espaço subendotelial de Disse, mediando as interações funcionais destas células com hepatócitos e células de Ito (WINWOOD & ARTHUR, 1998). A membrana celular é enrugada com numerosas invaginações e o citoplasma contém um grande número de lisossomos e fagossomos, retículo endoplasmático rugoso abundante, poliribossomos, complexos de Golgi e mitocôndrias. Estes aspectos variam com o

estágio de ativação celular (WINWOOD & ARTHUR, 1998). Várias funções têm sido associadas às células de Kupffer, principalmente a endocitose, o processamento de antígenos, a citotoxicidade e a secreção de substâncias biologicamente ativas.

A capacidade de endocitose das células de Kupffer é bem demonstrada, *in vivo* e *in vitro*, pela fagocitose e/ou pinocitose de vírus, bactérias e outros microorganismos; enzimas e endotoxinas nocivas vindas do trato gastrointestinal; leucócitos e eritrócitos senescentes; antígenos e complexos imunes; hormônios; lipoproteínas e substâncias exógenas, como carbono coloidal, ouro e látex. As células de Kupffer têm uma alta capacidade de depuração de endotoxinas do sangue circulante. Também degradam hemoglobina, promovendo a recirculação do ferro. A endocitose ocorre principalmente via receptores, como os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, fração C₃ de complemento, galactose e manose, entre outros (BOUWENS *et al.*, 1992).

Células de Kupffer podem agir como apresentadoras de antígenos e induzir resposta imune específica *in vitro* e *in vivo*, desde que ativadas. Contudo, sua função primária é a de seqüestrar antígenos (prevenindo uma resposta imune antígeno-específica), e evitar, por exemplo, respostas imunes contra proteínas da dieta e componentes normais do sangue portal. As células de Kupffer podem, inclusive, propiciar tolerância antigênica, pela digestão de material imunogênico. Células de Kupffer expressam mal receptores MHC classe II em estado basal, enquanto que uma forte expressão é observada em células ativadas (BOUWENS *et al.*, 1992).

As células de Kupffer são capazes de produzir citotoxicidade direta, mediada pela secreção de TNF- α e pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BOUWENS *et al.*, 1992). Quando ativadas por antígenos específicos, via receptor, ou por imunomoduladores (lipopolissacarídeos, muramilpeptídeo, interferon- γ ; etc), as células de Kupffer desencadeiam a síntese e a secreção de um amplo espectro de substâncias (WINWOOD & ARTHUR, 1998).

As células de Kupffer relacionam-se, no sinusóide hepático, com outros tipos celulares (figura 1):

1. As células endoteliais contém pequenas fenestrações de forma a permitir a difusão livre de partículas menores do que $0,02 \mu\text{m}$ do sangue pelo espaço de Disse até os hepatócitos, e a impedir o movimento de partículas maiores, como os remanescentes de quilomícrons. Estas células têm capacidade de endocitose e também sintetizam e secretam mediadores inflamatórios e vasoativos (endotelina, IL-1, IL-6, NO[•], PGI₂). (BOUWENS *et al.* 1992 e DECKER, 1997).
2. As células de Ito, que têm origem mesenquimal e estão situadas no espaço de Disse, são a principal fonte de componentes da matriz extracelular e também o principal sítio de armazenamento de vitamina A. Elas são capazes de secretar fatores de crescimento de fibroblastos e hepatócitos, TGF- β , PGE₂, PGD₂ e PGF_{2 α} (BOUWENS *et al.* 1992, DECKER, 1997 e JOHNSON, 1992).
3. As "pit cells" são representantes de uma linhagem de linfócitos granulares grandes, não-T e não-B, presentes na circulação e em vários órgãos não linfóides. (BOUWENS *et al.* 1992 , DECKER, 1997). Alguns autores as consideram como células "Natural Killer" específicas do fígado, as pit cells de ratos possuem um alto nível de atividade citolítica contra uma variedade de células tumorais e células infectadas por vírus (LUO, 2000). São capazes de secretar interferon- γ . Estão localizadas no lúmen sinusoidal, no espaço de Disse e entre os hepatócitos e provavelmente migram entre o fígado e o sangue (BIOULAC-SAGE *et al.* 1986).

Todos estes tipos celulares convivem em um sistema inter-regulado. Células endoteliais e células de Ito respondem às substâncias liberadas pelas células de Kupffer ativadas.

1.2. Substâncias produzidas e secretadas pelas células de Kupffer ativadas

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de fagocitose pode ser acompanhado pela liberação de moléculas específicas, o contato entre a superfície da partícula e seu receptor de superfície no macrófago induz a produção de componentes como espécies reativas do oxigênio e metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides). Dependendo do tipo de receptor envolvido, caminhos diferentes de transdução podem ser ativados, então não é necessário que todos os sinais possíveis sejam produzidos simultaneamente. A síntese e liberação de substâncias sinais não requer a endocitose completa do material fagocitado, o simples contato deste material com seu receptor específico ou sítios ligantes são suficientes para iniciar a resposta (DECKER, 1990).

As células de Kupffer também podem ser estimuladas ou ativadas por substâncias solúveis que se ligam a receptores específicos na membrana plasmática como a fração C5a do complemento, N-formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina e interferon- γ , Fc, nucleotídeos trifosfato e difosfato ou no citosol como lipopolissacarídeos (LPS) e ésteres de forbol, conduzindo a liberação de mediadores ou sinais moleculares por mecanismos diferentes, tornando estas células capazes de citotoxicidade (DECKER, 1990, SHIBATA *et al.*, 1991).

Como ilustra a figura 2, uma proteína G, associada à interação ligante-receptor, é fundamental na transdução de sinais a partir da membrana plasmática. Algumas enzimas são reguladas por proteína G, como a adenilato ciclase, estimulada por G_s e inibida por G_i , e a fosfolipase C, que hidrolisa fosfatidil inositol fosfato em myo-inositol fosfato e diacilglicerol (DECKER, 1990).

A ativação da adenilato ciclase (figura 2) seguida pelo aumento intracelular na concentração de AMP_c é observada após um tratamento das células de Kupffer com PGE_2 e LPS. AMP_c media a síntese e liberação de colagenase pelas células de Kupffer, uma enzima importante para o remodelamento após lesões teciduais (DECKER, 1990).

O aumento da atividade da Fosfolipase C pode conduzir a ativação da proteína quinase C, para a mobilização de Ca^{2+} do retículo endoplasmático

(Ca_{re}^{2+}) e, possivelmente, para o influxo de Ca^{2+} do exterior da célula. Deste modo, a proteína quinase e um segundo mensageiro (Ca^{2+}) são mobilizados diretamente durante a quebra do ácido araquidônico a partir de diacilglicerol e ativação de fosfolipase A_2 por Ca^{2+} /calmodulina são efeitos secundários conduzindo a liberação de importantes moléculas sinalizadoras, os eicosanóides. Fosfolipase C é acoplada a proteína G. O sinal de transdução através do diacilglicerol e do Inositol trifosfato dependem de interações com o Ca^{2+} , o segundo mensageiro necessário para a ligação à membrana plasmática e ativação da proteína quinase C, enquanto as proteínas fosforiladas por proteína quinase C podem influenciar o movimento de Ca^{2+} e outros ligantes na célula. A proteína quinase C esta envolvida na ativação de NADPH oxidase e do carregador Na^+/H^+ , enquanto o influxo de Ca^{2+} é necessário para ativação de fosfolipase A_2 e síntese de eicosanóides (DECKER, 1990).

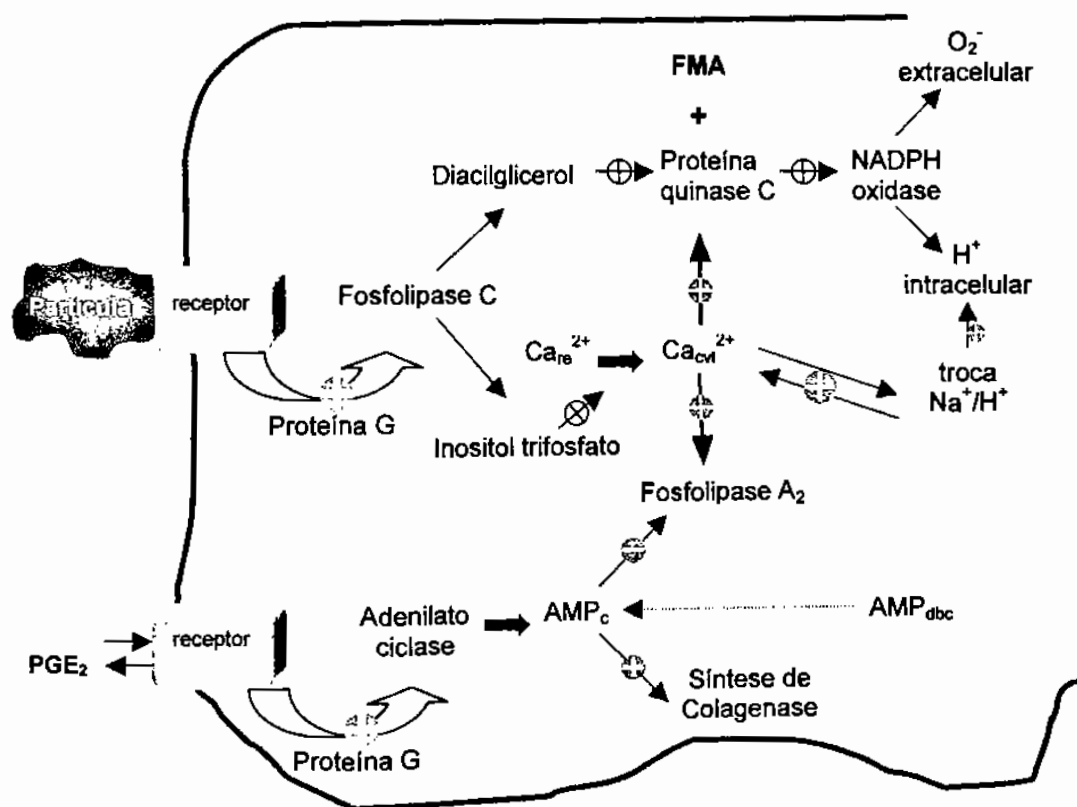


Figura 2 – Esquema da ativação da célula de Kupffer baseado em um modelo proposto por DECKER, 1990.

1.2.1. Moduladores de funções celulares

As células de Kupffer produzem diversos tipos de mediadores inflamatórios. Entre os mais importantes, estão os eicosanóides, o fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas.

Os eicosanóides são lipídios de baixo peso molecular, e seu precursor predominante é o ácido araquidônico, que está presente nos tecidos e fluidos. O ácido araquidônico é liberado pela ação das fosfolipases, especialmente a fosfolipase A_2 , que tem sua atividade aumentada em células de Kupffer ativadas. O ácido araquidônico é convertido em eicosanóides por duas vias (DECKER, 1986 e DECKER *et al.*, 1986).

Uma primeira via, denominada via da ciclooxigenase, origina as prostaciclina (PGI_2), que atuam como vasodilatadoras, inibem a agregação plaquetária e a aderência à superfície endotelial, são depressoras de fagocitose e antagonistas de TXA_2 , as prostaglandinas ($PGF_{2\alpha}$, PGE_2) consideradas como indutoras de trabalho e auto-reguladoras das células de Kupffer (figura 2) respectivamente, e tromboxano A_2 (TXA_2), vasoconstritor, estimulador de agregação plaquetária e aderência de células endoteliais (DECKER, 1986 e DECKER *et al.*, 1986).

Uma segunda via denominada via da lipoxigenase, origina o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que atua como agente quimiotático e os leucotrienos (LTB_4 , que tem como principais funções a quimiotaxia, agregação de leucócitos, liberação de O_2^- e enzimas e inibição da síntese de prostanóides nas células de Kupffer e LTE_4 , que atua como vasoconstritor no fígado) (DECKER, 1986 e DECKER *et al.*, 1986).

O Fator ativador de plaquetas é um fosfolipídio liberado por várias células incluindo células de Kupffer. PAF, não é armazenado, mas é rapidamente sintetizado com auxílio da fosfolipase A_2 , após um estímulo. O PAF promove a liberação de aminas vasoativas de trombócitos e agregação de plaquetas, é um potente fator quimiotático para plaquetas, monócitos e eosinófilos, aumenta a permeabilidade vascular, induz a desgranulação de neutrófilos e a ativação de

macrófagos. Células de Kupffer expostas a PAF produzem superóxido e eicosanóides, e mostram um aumento na produção de inositol fosfato e na concentração de Ca^{2+} intracelular (DECKER, 1990 e SHIBATA, *et al* 1991).

As citocinas são proteínas solúveis envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, como crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular e processos de reparo. A maior função das citocinas consiste em mediar interações entre sistema imune e sistema inflamatório. Células de Kupffer, secretam interleucinas (IL-1, IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), interferons e fatores de crescimento (TGF- β , TGF- α e HGF) (BURGER, *et al.*, 2002).

A IL-1 e os TNFs são produzidos em sítios inflamatórios próximos às células endoteliais, induzindo nestas células a expressão de moléculas de adesão que interagem com linfócitos sangüíneos e ocasionam seu extravasamento. Além disso, produzem agentes quimiotáticos que recrutam polimorfonucleares, monócitos e linfócitos (BURGER, *et al.*, 2002). A interleucina -1, que é também conhecida como fator ativador de linfócitos ou como pirógeno endógeno, tem a capacidade de estimular a produção de IL-2 pelas células T (DECKER, 1990).

A IL-6 também é conhecida como interferon - β 2, fator estimulador 2 de células B ou fator estimulador de hepatócitos, é o mais potente estimulador conhecido da síntese de proteínas de fase aguda em hepatócitos. Além disso, é capaz de induzir a maturação terminal e estimular a secreção de IgM e IgA em células B, e aumentar a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas (DECKER, 1990 e BURGER, *et al.*, 2002).

O fator de necrose tumoral TNF- α é uma citocina essencial na defesa do hospedeiro frente a uma infecção ou inflamação. Está associada à indução de expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, e auto-regulação de macrófagos (HOFFMANN, *et al.*, 1993 e BURGER, *et al.*, 2002).

A interação do Interferon- γ (INF- γ) com seu receptor na membrana dos macrófagos induz a ativação de proteína quinase C e causa a mobilização de Ca^{2+} , desta forma ativa macrófagos aumentando sua capacidade de promover a defesa do hospedeiro pelo metabolismo oxidativo, assim como o metabolismo oxidativo dos macrófagos (SHIBATA, *et al* 1991).

O fator de crescimento de hepatócito (HGF), que estimula mitose e regeneração de hepatócitos em lesões e o fator de crescimento transformante TGF- β constituem um grupo de polipeptídios de ação reguladora tanto da mielopoiese como da linfopoiese, e estimulam células de Ito a produzirem colágeno (DECKER, 1990 e SHIBATA, *et al* 1991).

1.2.2. Mecanismos de defesa e citotoxicidade

Nas células de Kupffer, assim como em outros macrófagos e nos neutrófilos, são produzidas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em resposta a um estímulo inflamatório. Durante a fagocitose de antígenos particulados, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (HO^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO) formam-se no interior do vacúolo fagocítico.

A formação de superóxido é catalisada por NADPH oxidase localizada na membrana plasmática, que reduz o oxigênio a $O_2^{\cdot-}$. A produção de $O_2^{\cdot-}$ pelas células de Kupffer não requer Ca^{2+} , mas é regulada pela proteína quinase C. As espécies reativas produzidas pelas células de Kupffer ajudam os macrófagos a inativar e destruir partículas ou organismos que foram fagocitados (DECKER, 1990).

O óxido nítrico é um potente mediador citotóxico e regulatório. A produção deste mediador pelas células de Kupffer é dependente da presença de l-arginina. A produção pode ser bloqueada por inibidores da óxido nítrico sintase, n-monomethyl-l-arginina e interleucina-1 e interleucina-4 (LASKIN, *et al.*, 1993).

1.2.3. Enzimas lisossomais e proteinases neutras

As Células de Kupffer possuem representantes deste grupo de substâncias pré-formados em seu interior, mas necessitam de um estímulo para sua liberação.

entre eles, a lisozima, catepsina, β -glicuronidase, β -acetil glicosaminidase, peroxidase, esterases e acetilases (WINWOOD & ARTHUR, 1998).

As proteinases neutras também atuam como mediadores de lesão tecidual, dentre elas o ativador de plasminogênio, collagenase tipo IV (95 kDa), gelatinase B e collagenase intersticial (WINWOOD & ARTHUR, 1998).

1.2.5. Outras substâncias

As células de Kupffer são capazes de secretar componentes do sistema complemento, apolipoproteína E, α_1 -iduronidase e fosfolipase A_2 , uma enzima intracelular ligada a membrana e ativada por Ca^{2+} , relacionada com a liberação de ácido araquidônico (DECKER, 1986).

1.2.6. Sistema auto-regulatório da estimulação das células de Kupffer

Alguns mediadores interagem e estabelecem um controle por retroalimentação (figura 3). Por exemplo, o estímulo inflamatório promove nas células de Kupffer a síntese de $TNF-\alpha$ e $IL-1\beta$, que também estimulam as células de Kupffer. Como parte da resposta a estes mediadores, estas células sintetizam e liberam PGE_2 , que funciona como regulador negativo para a ativação das células de Kupffer (DECKER, 1997).

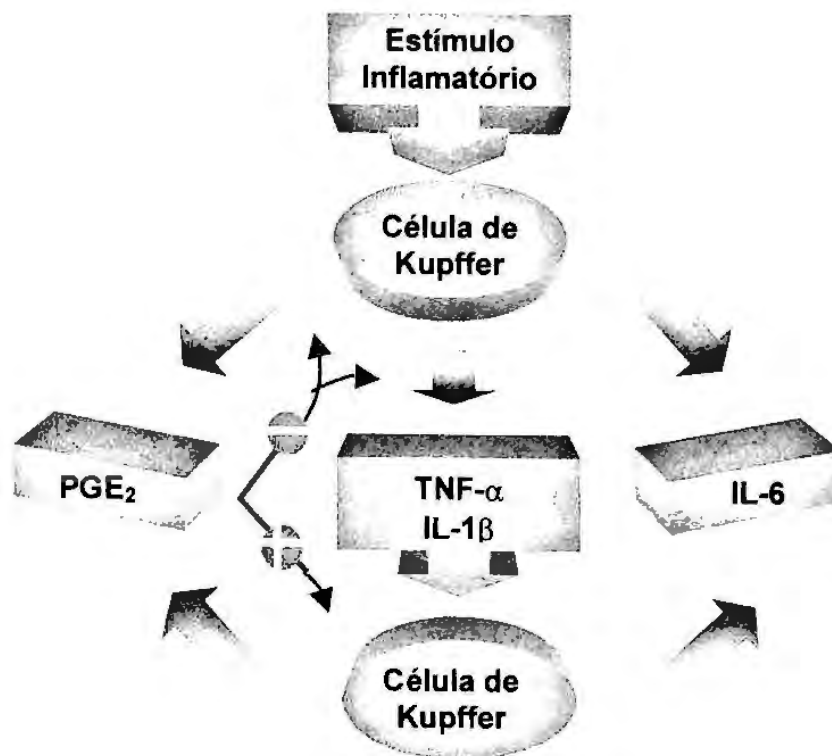
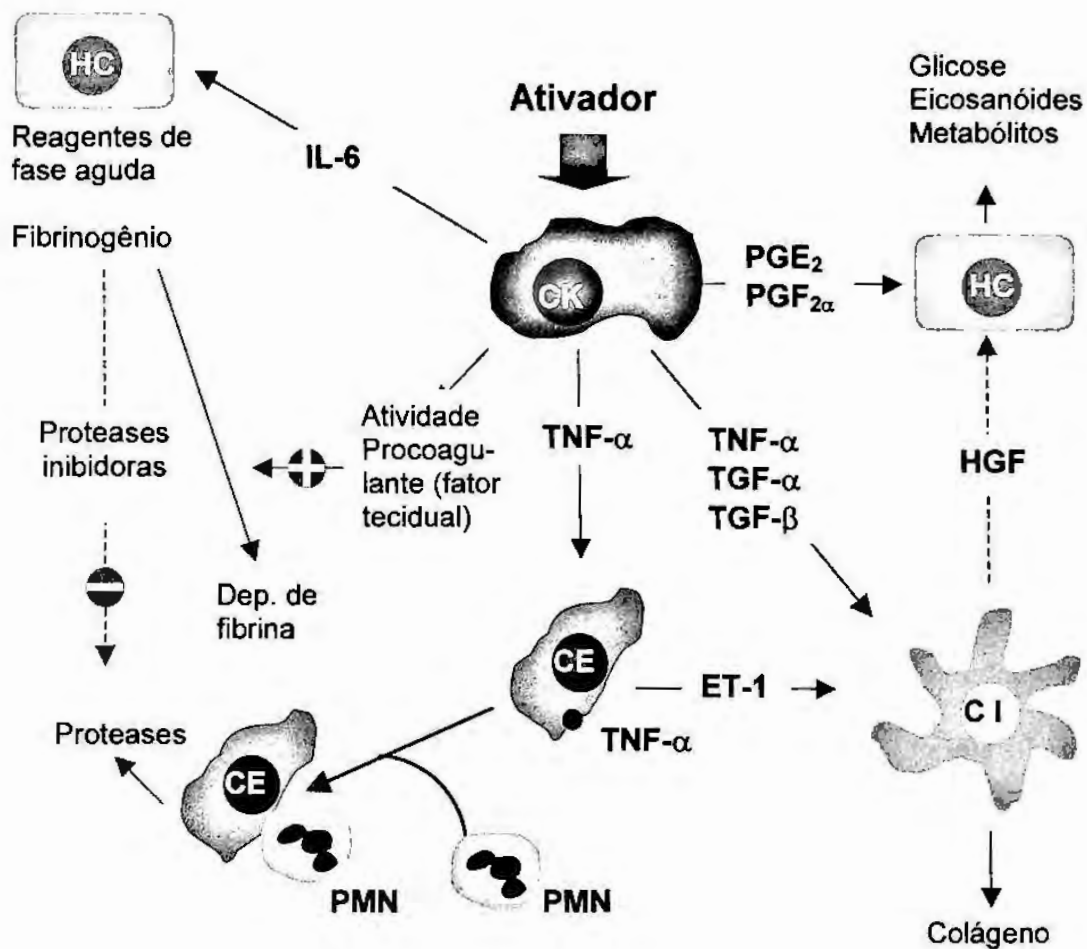


Figura 3 – Mecanismo auto-regulatório da estimulação de células de Kupffer (DECKER, 1997).

1.2.7. Interação entre as células do fígado e os mediadores químicos

Em síntese, como mostra o esquema proposto por DECKER (1997) a ativação das células de Kupffer leva a uma cascata de ativação de outras células, presentes normalmente no fígado, ou recrutadas durante a inflamação (monócitos e polimorfonucleares) e amplifica o processo inflamatório.

A multiplicidade das interações celulares no sinusóide hepático, como representada na figura 4, é importante para o estabelecimento da homeostasia funcional do fígado.



CK – célula de Kupffer;	CI – célula de Ito;
HC – hepatócito;	PMN – polimorfonucleares.
CE – célula endotelial	

Figura 4 – Esquema das interações bioquímicas entre células de Kupffer, outras células hepáticas e polimorfonucleares neutrófilos durante a inflamação (DECKER,1997).

Células de Kupffer ativadas secretam PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ induzindo os hepatócitos a sintetizarem eicosanóides e metabólitos e estimulando um aumento na taxa de glicogenólise. Secretam $TNF-\alpha$, $TGF-\alpha$ e $TGF-\beta$ que transformam as células de Ito em células com comportamento de fibroblastos, capazes de

sintetizar colágeno e secretar HFG, que induz mitose em hepatócitos. O TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos. As células endoteliais secretam endotelina-1 que também estimulam células de Ito. E, por fim, as células de Kupffer secretam IL-6, que estimula os hepatócitos a produzirem reagentes de fase aguda, e fibrinogênio levando à deposição de fibrina. Simultaneamente, o fibrinogênio leva a formação de proteases inibidoras que fazem um controle por retroalimentação negativa para produção de proteases, e a atividade procoagulante induzida pela célula de Kupffer opera como um mecanismo de retroalimentação positiva para a formação de depósitos de fibrina (DECKER, 1997).

1.3. Desenvolvimento ontogenético das células de Kupffer

Nos mamíferos, o saco embrionário é o primeiro órgão hematopoiético em que os macrófagos se desenvolvem. Em embriões de camundongos com 8,5 dias de gestação, o sistema hematopoiético começa a ser formado. Em 9 dias, células mononucleares positivas para F4/80, um anticorpo monoclonal para macrófagos murinos, são detectadas imuno-histoquimicamente no lúmen vascular e saco embrionário. Estas células mononucleares são redondas com grandes nucléolos, complexo de Golgi pobre, com poucas organelas citoplasmáticas e poliribossomos abundantes. Diferenciação de células imaturas (macrófagos primitivos) em macrófagos com aspectos ultraestruturais mais maduros contendo abundantes poliribossomos e microvilos ou filopodia prolongados (macrófagos fetais) é muito rápido ocorrendo em um dia, ambos são negativos para atividade de peroxidase por citoquímica ultraestrutural (NAITO *et al.*, 1997).

Em ratos, o desenvolvimento de macrófagos primitivos e fetais ocorre no saco embrionário e sua forma e características ultraestruturais são semelhantes à dos camundongos. A formação do fígado fetal primordial dos ratos inicia-se no 11^o dia de gestação e a hematopoiese fetal, no 12^o. No lúmen do sinusóide hepático há eritroblastos, megacarioblastos e macrófagos primitivos ou fetais e figuras de

mitose são freqüentemente encontradas. O surgimento de atividade de peroxidase no envelope nuclear e retículo endoplasmático rugoso dos macrófagos de rato ocorre no 13^o a 14^o dia de gestação. Quase todos macrófagos mostram aspectos ultraestruturais de macrófagos residentes no 18^o dia de gestação, apresentando positividade para os anticorpos ED1 e ED2, que serão discutidos adiante e atividade de peroxidase no envelope nuclear e retículo endoplasmático rugoso. Estes dados sugerem que estes macrófagos são os macrófagos primitivos ou fetais originados no saco embionário, que se diferenciam em macrófagos residentes (NAITO *et al.*, 1997).

1.4. Diferenciação das células de Kupffer

De acordo com o conceito de sistema fagocítico mononuclear, tanto os macrófagos do exudato inflamatório como macrófagos residentes são derivados de monócitos sangüíneos, terminalmente diferenciados em células de baixa capacidade proliferativa (TAKEZAWA *et al.*, 1995).

Monoblastos derivam das unidades formadoras de colônia de monócitos (CFU-M) e unidades formadoras de colônia de granulócitos e monócitos (CFU-GM) originadas da unidade formadora de colônia CFU-S, a célula indiferenciada pluripotente (stem-cell). Um monoblasto divide-se uma vez dando origem a dois promonócitos, e por uma única divisão um promonócito produz dois monócitos. Desta maneira, quatro monócitos são produzidos por um monoblasto na medula óssea. A produção de monócitos é controlada por vários fatores de crescimento, assim como por interleucinas (IL-6, IL-3), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (CSF-GM) e fator estimulador de colônia de macrófagos (CSF-M). O CSF-M é o estimulador mais importante no desenvolvimento e diferenciação da linhagem de macrófagos restrita, pertencente ao sistema fagocítico mononuclear, sendo devido a ele que a população de macrófagos é considerada como membro do sistema fagocítico mononuclear (LORENZI, 1992 e NAITO *et al.*, 1997).

1.5. Proliferação de macrófagos

Hepatócitos e células sinusoidais produzem CFS-M e CSF-GM que regulam a proliferação, diferenciação e maturação das células de Kupffer

A capacidade proliferativa local e a auto renovação das células de Kupffer, tanto em estado normal, como em condições inflamatórias ou experimentais, pode ser avaliada em estudos *in vitro* pela incorporação de [3H]-timidina no DNA de macrófagos hepáticos (HOEDEMAKERS *et al.*, 1993 e YAMAMOTO, *et al.*, 1996).

Autoradiografias com [3H]-timidina e figuras de mitose frequentemente encontradas no fígado fetal de ratos, demonstram a alta capacidade proliferativa destas células em tecidos fetais. Este potencial proliferativo dos macrófagos fetais no fígado é importante para sua sobrevivência local e colonização para outros tecidos fetais, via corrente sanguínea. Deste ponto de vista o fígado fetal é um órgão central para a produção e suplementação de macrófagos e seus precursores para outros tecidos (NAITO *et al.*, 1997).

Em fígados adultos, as células de Kupffer mostram baixa capacidade proliferativa, cerca de 2% destas células são marcadas pela autoradiografia com [3H]-timidina em condições normais (NAITO *et al.*, 1997), mas esta taxa é aumentada pela hepatectomia parcial e pela administração de vários estimuladores, como o zymosan, por exemplo (GALE *et al.*, 1978, CROFTON *et al.*, 1978).

1.6. Subpopulações de células de Kupffer

Diferenças morfológicas, funcionais e de distribuição entre as células de Kupffer sugerem que esta população é heterogênea, e que por imunohistoquímica é possível identificá-las (ARMBRUST *et al.* 1996).

O anticorpo ED1 reconhece a maioria das populações de macrófagos, assim como monócitos do sangue periférico e células precursoras na medula

óssea. Originalmente ED1 foi descrito como um antígeno citoplasmático, citometria de fluxo e estudos ultraestruturais detectam uma fraca expressão de ED1 em membrana plasmática de macrófagos peritoneais, intracelularmente o anticorpo ED1 mostra uma coloração granular. O anticorpo ED1 reconhece uma glicoproteína de cadeia simples de 90000-110000 MW que é expressa predominantemente na membrana lisossomal e levemente na superfície celular. Os níveis de expressão assim como de glicosilação são acentuados pelo estímulo fagocítico, uma vez que, o processo de fagocitose envolve a endocitose de partículas e formação do fagossomo. Fagossomos fundem-se a lisossomos, derivados do Complexo de Golgi formando os fagolisossomos. Esta expressão diferencial de um antígeno específico de macrófagos na superfície celular e membrana intracitoplasmática pode ser causada pela existência de um fluxo substancial de membrana entre os vários compartimentos, visto que a reciclagem da membrana plasmática é um aspecto importante da fagocitose. O antígeno é expresso abaixo de condições detectáveis em quase todos membros do sistema fagocítico mononuclear. Além disto, poucos outros tipos celulares também expressam ED1 quando ativados (DAMOISEAUX, 1994).

O anticorpo ED2 reconhece um antígeno de membrana de macrófagos residentes de rato e é também utilizado para identificar células de Kupffer (DIJKSTRA *et al.*, 1985, YAMATE *et al.*, 2001 e IDE *et al.*, 2002 e). Assim, pode-se considerar a existência de duas populações com distribuição anatômica, morfologia e características funcionais distintas (ARMBRUST *et al.* 1996, SATO *et al.*, 1998 e YAMATE *et al.*, 1999). Uma população de células pequenas, positivas para anticorpo ED1, mas negativa para anticorpo ED2, está presente ao redor da tríade portal e das veias centro lobulares. Esta população é descrita na literatura como "células de Kupffer pequenas", "precursores locais de células de Kupffer" ou incluída indistintamente na população de macrófagos hepáticos chamados coletivamente pelo nome "células de Kupffer". Uma outra população de macrófagos grandes, positiva para anticorpo ED1 e ED2, localizada ao longo dos sinusóides, é descrita como a população de macrófagos hepáticos teciduais maduros, muitas vezes associadas ao nome "grandes células de Kupffer" ou

somente “células de Kupffer”, com ou sem a distinção explícita com a população anterior (ARMBRUST *et al.* 1996, SATO *et al.*, 1998 e YAMATE *et al.*, 1999).

1.7. Efeitos de hormônio tireoideano sobre as células de Kupffer

A administração de 3,3',5-L-triiodotironina (T_3) em ratos induz a uma expansão da população de células de Kupffer (TAPIA *et al.*, 1997). Duas hipóteses se colocam sobre a gênese desta hiperplasia, cujo mecanismo não está ainda esclarecido.

Uma resposta pró-inflamatória das células sinusoidais, que potencialmente desencadeia o recrutamento de monócitos circulantes, implica a produção de mediadores inflamatórios, decorrente da condição de desequilíbrio do metabolismo de oxido-redução no tecido hepático.

Diversas observações corroboram esta hipótese. Aumentos na produção de espécies reativas de oxigênio (microsomal, mitocondrial e peroxisomal) e nitrogênio (citosólica) associam-se à aceleração do metabolismo aeróbico responsável pela ação calorigênica de T_3 no tecido hepático (FERNÁNDEZ *et al.*, 1985, VIDELA, 2000, VENDITE *et al.*, 2002 e VENDITE *et al.*, 2003). Além do aumento na produção de espécies reativas, verifica-se aumento na excreção biliar de glutathiona oxidada, na lipoperoxidação e na oxidação de proteínas hepáticas (TAPIA *et al.*, 1999 e VIDELA, 2000). Simultaneamente, são comprometidos os principais sistemas antioxidantes do tecido hepático. Por exemplo, inativam-se a superóxido dismutase e a catalase, e diminuem os conteúdos teciduais de glutathiona reduzida (GSH) e de antioxidantes lipossolúveis (FERNÁNDEZ *et al.*, 1991 e TAPIA *et al.* 1999). Ratos tratados com T_3 apresentam aumentos na produção de TNF- α , no consumo de oxigênio e na capacidade fagocítica de células de Kupffer, efeitos que podem ser abolidos pela administração de cloreto de gadolínio ($GdCl_3$) (TAPIA *et al.*, 1997 FERNÁNDEZ *et al.*, 2002). O $GdCl_3$, um inativador seletivo de células de Kupffer, também reduz significativamente o consumo de GSH, a lipoperoxidação e a produção de óxido nítrico (HARDONK, *et*

al., 1992 e TAPIA *et al.*, 1997). Paradoxalmente, a patofisiologia da hiperplasia das células de Kupffer não está claramente elucidada, sendo proposto que uma ação direta de T₃ induz a proliferação dos precursores locais das células de Kupffer, fenômeno análogo ao que se verifica com outros tipos celulares, entre eles o hepatócito (COLUMBANO *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 1999).

Em oposição à proposta anterior, a expansão não inflamatória da população de macrófagos conduz ao estresse oxidativo como um fenômeno secundário. Este trabalho foi desenhado para, a partir do estudo imuno-histoquímico de marcadores de subpopulações de macrófagos, em cortes de fígado de rato tratados com T₃, discriminar entre estas duas possibilidades para o efeito do hormônio tireoideano sobre as células de Kupffer.

2. Objetivos

Padronizar métodos de análise quantitativa, aplicáveis ao estudo de áreas marcadas com carbono coloidal e à avaliação da densidade de células marcadas por imuno-histoquímica em cortes histológicos de fígado de rato.

Caracterizar a contribuição das diferentes subpopulações de macrófagos para a hiperplasia de células de Kupffer associada ao hipertireoidismo experimental.

3. Material e Métodos

3.1. Animais:

Foram utilizados 38 ratos machos Sprague-Dawley pesando entre 250 a 350g e com três meses de idade, provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12 horas, $55 \pm 11\%$ de umidade, temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 15-20 trocas de ar/dia, água e alimentados *ad libitum* com ração comercial Purina[®] extrusada e irradiada própria para a espécie. O projeto de protocolo nº 22 esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.2. Modelo Experimental:

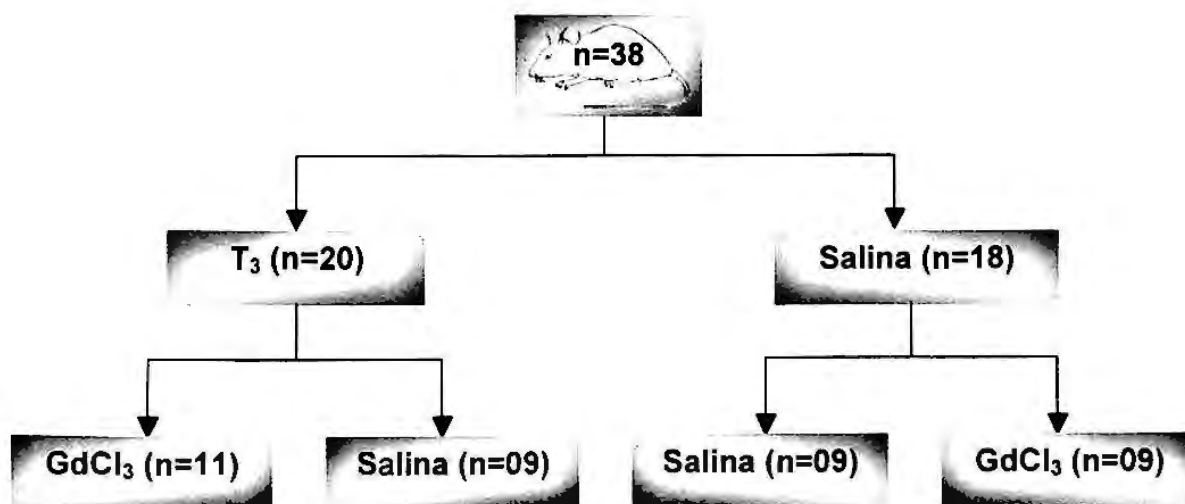


Figura 5 – Esquema da distribuição dos animais nos grupos experimentais.

3.3. Tratamento com T₃:

O hipertireoidismo funcional foi obtido pela injeção intraperitoneal 0,1 mg de T₃/kg de peso corpóreo por 3 dias consecutivos (SIMON-GIAVAROTTI, 2001). Aos controles foi administrado volume equivalente do veículo do hormônio, solução salina (Figura 5).

3.4. Tratamento com Cloreto de Gadolínio (GdCl₃):

Metade dos animais de cada grupo (ratos controle e ratos tratados com T₃) receberam, adicionalmente, duas doses de 10 mg/kg de peso corpóreo cada uma, de GdCl₃ ou volume equivalente de solução salina 0,9% (Figura 5), na veia da cauda, sendo a primeira dose no dia 1 e a segunda no dia 3 (SIMON-GIAVAROTTI, 2001). Todas as injeções foram feitas nos animais anestesiados com injeção intramuscular de Xilazina (Anasedan® 0,08mg/kg de peso) e Ketamina (Dopalen® 0,1mg/kg de peso).

3.5. Procedimento cirúrgico:

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Xilazina (Anasedan® 0,08mg/kg de peso) e Ketamina (Dopalen® 0,1mg/kg de peso) e submetidos à laparotomia. Amostras de sangue foram retiradas da veia cava, com seringa descartável de 10 ml, e colocadas em tubo seco sem anticoagulante por 1 hora. As amostras de sangue foram centrifugadas em 1500 g por 10 min e o soro congelado a - 20 ° C. Os fígados foram removidos, lavados em solução salina 0,9%, e divididos em alguns fragmentos que foram fixados em metacarn (metanol 60%, ácido acético 10% e clorofórmio 30%) Ao fim do experimento os animais foram sacrificados por exsanguinação, ainda sob efeito da anestesia (figura 6).

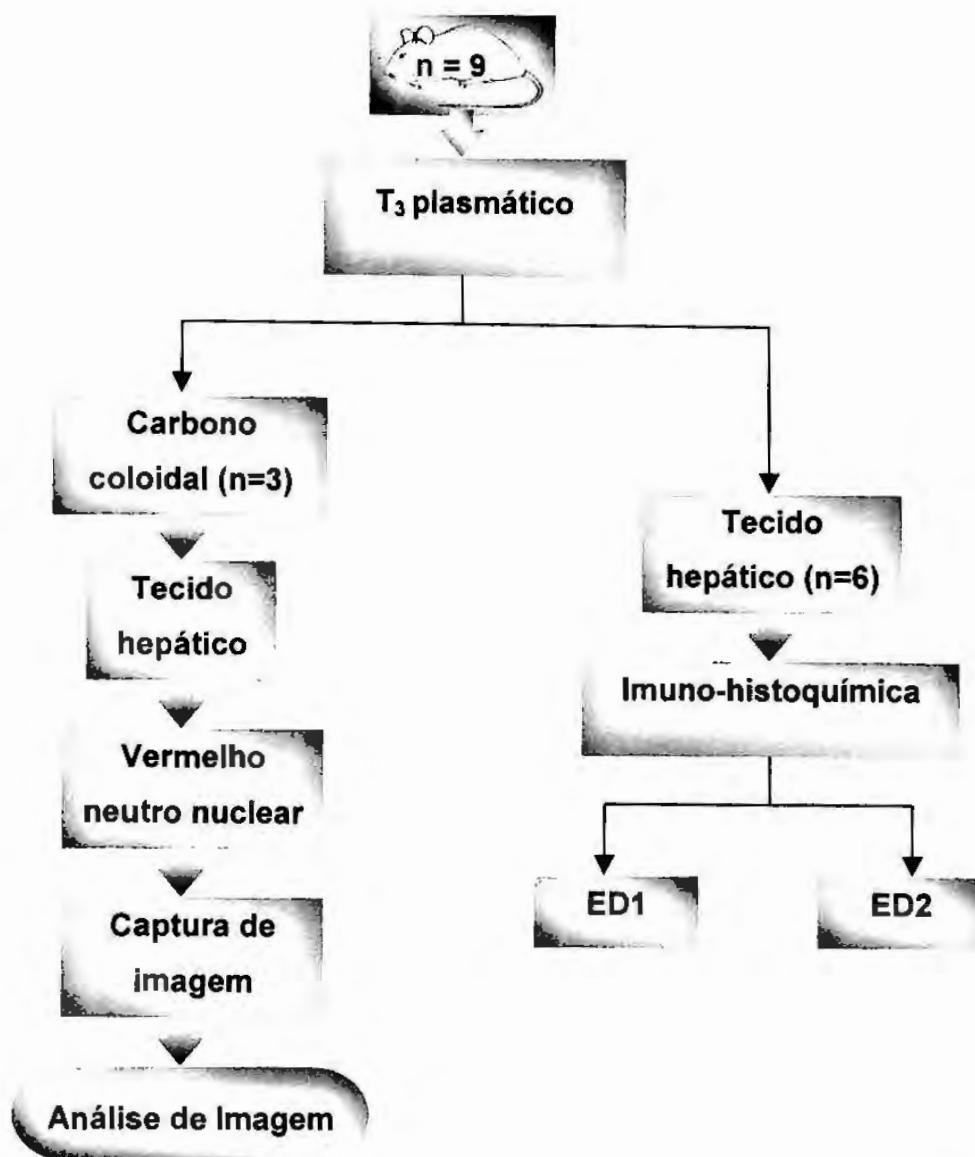


Figura 6 – Esquema do procedimento experimental: grupos de ensaios realizados.

3.6. Determinação da concentração plasmática de T_3 :

Triiodotironina total circulante foi determinada no soro através do Imunoensaio Enzimático de Micropartículas (MEIA) Imx T_3 total (Abbott) utilizando o equipamento IMX (Abbott) e o programa IMX módulo de ensaio tireóide, versão 4, segundo instruções do fabricante (Abbott). Foi utilizada a curva de calibração

para T₃ do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (LAC), que foi comparada a valores de referência para ratos (TAPIA, *et. al.*, 1999).

3.7. Procedimento histológico:

As amostras de tecido permaneceram imersas em metacarn por 4 horas à 4°C. O fixador foi então substituído por álcool absoluto, permanecendo por 8 a 10 horas. Para a inclusão das amostras em blocos de parafina, estas foram processadas em três banhos de álcool absoluto por 30 min, seguidos da diafanização do material com xilol em 3 banhos de 15 minutos, finalizando com três banhos de parafina por 30 minutos cada, em estufa à 58°C para a impregnação das peças. Os blocos foram cortados em micrótomo com a espessura de 3 a 5 µm e os cortes foram colocados sobre lâminas silanizadas.

3.8. Avaliação da captação de carbono coloidal:

Carbono coloidal (Rotring) foi dialisado em membrana semipermeável Spectrapor 12000-14000 mesh, conforme o esquema a seguir (figura 7):

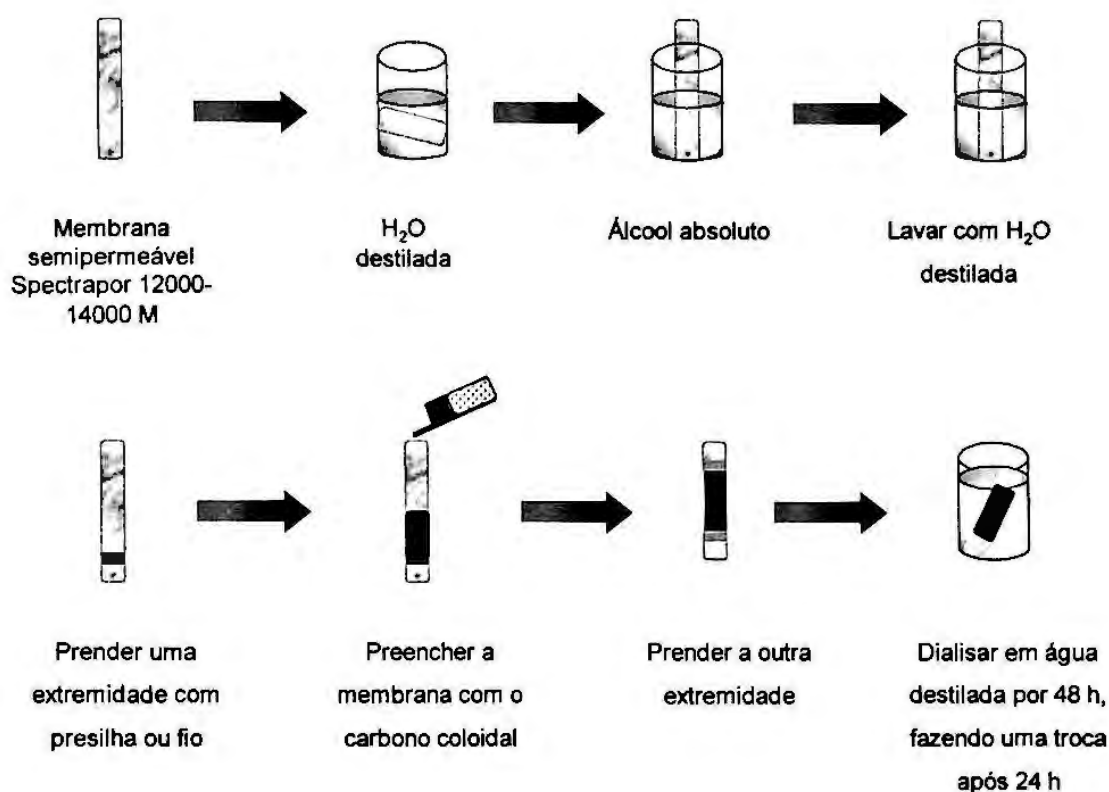


Figura 7 – Esquema da diálise do carbono coloidal.

A concentração foi calculada após a medida da absorbância de luz, em 623 nm, pela solução dialisada, utilizando-se o coeficiente de extinção específica $0,97 \text{ (mg/ml)}^{-1}$ (TAPIA *et al.*, 1996). A concentração da solução foi ajustada por diluição simples com água destilada e deionizada esteril. O carbono coloidal dialisado foi administrado por injeção endovenosa (veia porta hepática), na dose de 640 mg/kg, 30 minutos antes do sacrifício, a 3 animais de cada grupo (MATSUO *et al.*, 1985 e TAPIA, *et al.*, 1997).

Cortes de 5 μm foram desparafinizados e lavados em água corrente por 3 minutos. Depois, foram contracorados com vermelho neutro nuclear (vermelho neutro 1%, ácido fênico 2% e ácido acético 2% em água de anilina a 2%) por 5 minutos. Após a etapa de contracoloração, os cortes foram novamente lavados em álcool 70^o por 1 minuto, diferenciados em álcool/formol/ácido acético (álcool 70^o. 85%, aldeído fórmico 15%, acidificado com ácido acético), desidratados e montados com entellan (BEHMER *et al.*, 1976, SHI, *et al.*, 1998).

3.9. Estudo das subpopulações de macrófagos:

Foram utilizados anticorpos monoclonais ED1 (Serotec, Oxford, UK), específico para macrófagos/monócitos e células dendríticas e ED2 (Serotec, Oxford, UK) que marca células de Kupffer (Kono *et al.*, 2002 e Dijkstra *et al.*, 1985) e sistema de revelação EnVision-ALP (Dako Carpinteria, CA):

1. Preparo das lâminas: cortes de 3 μm de espessura, em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em xilol (3 banhos de 5 minutos) e reidratados (dois banhos de 3 minutos em álcool 70^o, dois banhos de 3 minutos em álcool 50^o e um banho de 3 minutos em água destilada). Lavados com solução salina tamponada - Tween 20 a 0,05% (PBS T). Para diminuir reações de fundo foi utilizado um banho de 30 minutos em solução salina tamponada com leite desnatado molico a 5%
2. Anticorpo Primário: os cortes foram lavados com PBS T (3 banhos de 5 minutos), incubados em câmara úmida pernoite com o anticorpo primário diluído (ED1 1:500 e ED2 1:250) em PBS-BSA (solução salina tamponada - albumina bovina 1%).
3. Controle Negativo: foram utilizados cortes de fígados com 3 μm de espessura dos quatro grupos experimentais, que foram incubadas apenas com tampão PBS-BSA.
4. Polímero marcado com Fosfatase Alcalina: os cortes foram lavados com PBS T (3 banhos de 5 minutos) e incubados em câmara úmida com o anticorpo secundário por 30 minutos.
5. Solução de Substrato Cromógeno (Fast Red): o substrato cromógeno foi preparado durante a incubação com polímero marcado: 3 ml da solução do substrato cromógeno foi transferida para o tubo calibrado fornecido pelo Kit, então foi adicionado 1 tablete de Fast Red e misturado até sua dissolução completa. Finalmente, para o bloqueio da fosfatase alcalina endógena foram acrescentadas 3 gotas (120 μl) de Levamisol. Os cortes foram lavados em PBS T (3 banhos de 5 minutos) e a solução de substrato

cromógeno foi aplicada, com a pipeta Pasteur fornecida pelo Kit. A reação foi bloqueada com água destilada após 5 a 15 minutos.

6. Contracoloração com Hematoxilina: As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris lavadas em água de torneira por 5 minutos, alcalinizadas com 10 banhos em água amoniacal 37 mM (2,5 ml de hidróxido de amônio 15 M em um litro de água destilada) e lavadas novamente em água de torneira por mais 2 minutos.
7. Montagem: o excesso de água das lâminas foi retirado com papel toalha e montagem foi feita em meio aquoso (Glycergel®).

3.10. Análise de Imagem:

A análise de imagem foi utilizada na quantificação das áreas de carbono coloidal e na quantificação de células positivas para ED1 e células positivas para ED2 (figura 6).

Para a avaliação da captação do carbono coloidal, uma área de 0,53 mm², foi analisada em cada amostra (30 campos de 0,0177 mm²/campo). Imagens de áreas localizadas próximas aos espaços porta foram capturadas em microscópio óptico Olympus com aumento de 400x, através do programa Image-Pro® Plus versão 3.0 (Micronal) e analisadas com o programa ImageTool versão 3.00, disponibilizado gratuitamente pela Universidade do Texas San Antonio. A porcentagem de área marcada por carbono coloidal com relação à área total de células foi obtida pela razão entre a área de marcada por carbono e a área total de células, subtraída da área "branca" (espaços sinusoidais, luz de vasos) em cada campo quantificado.

A intensidade da contracoloração foi utilizada para normalizar as determinações dos vários campos de cada corte. Para evitar tendências, o limite de variação entre as amostras foi minimizado, pela preparação simultânea das amostras, e controlado, estipulando-se uma faixa de variação arbitrária para os

valores numéricos do limite de detecção ("threshold"), determinado automaticamente pelo programa de análise. Este valor não variou mais do que 10% entre as amostras.

Para quantificar o número de células ED1 e ED2, 30 campos com área de $70901,03 \mu\text{m}^2$, foram capturados em microscópio Olympus pelo programa Pro-Image® plus 3.0, em aumento de 200 vezes. Destes 30 campos, dez campos foram aleatoriamente selecionados em cada uma das regiões periportal, zona intermediária e centrolobular (zona I, II e III respectivamente) do lóbulo hepático.

Para definir as zonas I e III foram capturados campos com a presença da tríade portal e veia centrolobular respectivamente. A distância entre o centro dos vasos e a célula contada mais distante deles foi medida em todos os campos analisados, como uma forma de controle da área atribuída aleatoriamente a estas regiões. Campos representativos de zona II foram capturados em regiões desprovidas de vasos.

As células positivas de cada campo foram contadas manualmente com o auxílio do programa ImageTool versão 3.00. As áreas brancas de cada campo foram subtraídas da área total do campo, obtendo-se a área ocupada por células. Os resultados foram expressos como as médias das densidades de células em cada região, por animal estudado. A calibração foi obtida pela captura de uma escala micrométrica linear padrão, com precisão de 0,01mm.

3.11. Análise estatística dos resultados:

Os resultados de níveis de T_3 circulante e de captação de carbono coloidal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Os resultados de imuno-histoquímica para ED1 e ED2 foram estudados por ANOVA para medidas repetidas, após estabilização das variâncias pela transformação de Box-Cox com parâmetro $\lambda = \frac{1}{4}$. Em ambos os casos consideramos significantes os resultados com $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Concentração de T₃ circulante:

Tabela I – Concentração plasmática de T₃ (ng/mL)^a, segundo a condição de tratamento dos animais^b

	Salina	T ₃
Salina	0,41 ± 0,08 (n=6)	3,4 ± 1,2* (n=6)
GdCl ₃	0,48 ± 0,11 (n=6)	1,9 ± 1,1* (n=8)

*diferente dos outros grupos com $p \leq 0,001$ em todas as comparações (análise de variância, seguida do teste de Bonferroni)

^a Na primeira linha, as colunas mostram valores referentes aos grupos controle (salina) e tratado (T₃) e na segunda linha, os resultados dos subgrupos que receberam GdCl₃. As amostras analisadas foram colhidas no dia 4 do experimento.

^b Na primeira linha, as colunas mostram valores referentes aos grupos controle (salina) e tratado (T₃) e na segunda linha, os resultados dos subgrupos que receberam GdCl₃.

4.2. Avaliação da captação do carbono coloidal:

A captação de carbono coloidal aumentou no fígado de animais tratados com T_3 (Figura 8, Tabela II) e foi abolido pela administração de $GdCl_3$.

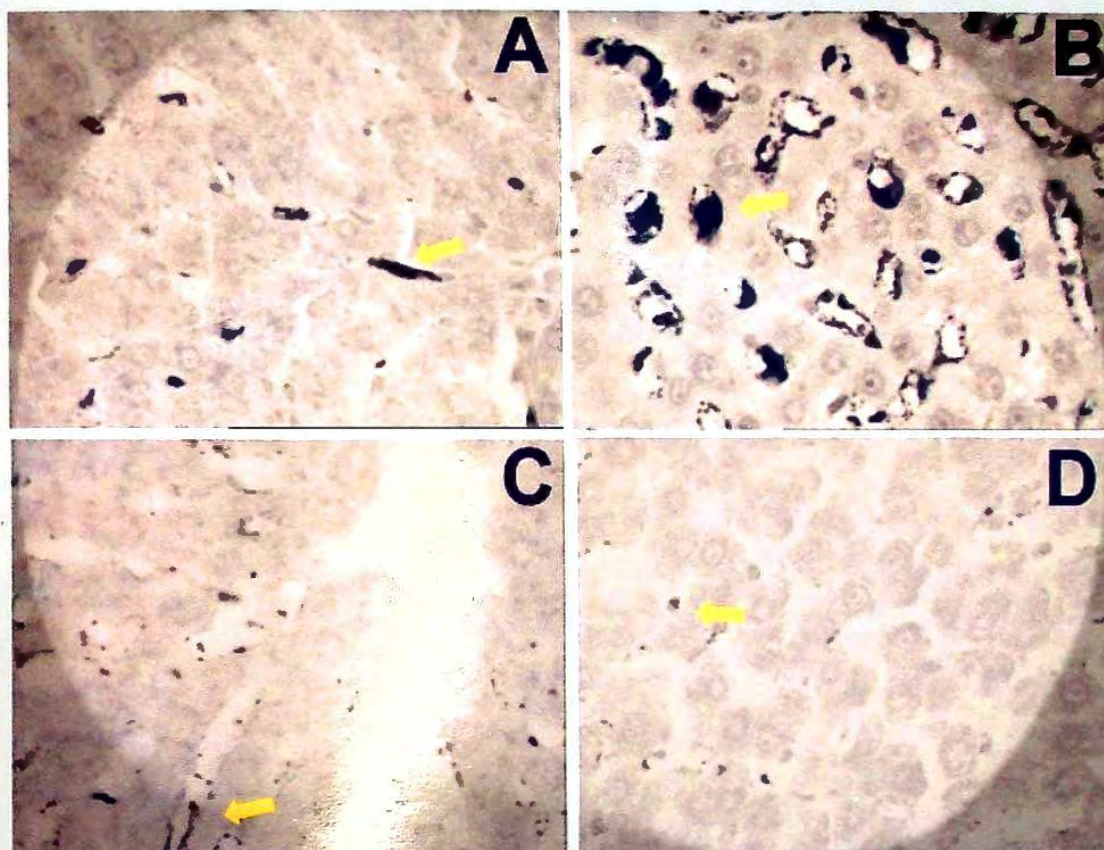


Figura 8 – Fotomicrografia representativa dos campos utilizados para a análise morfológica da captação de carbono coloidal de animais tratados com: A) salina, B) T_3 , C) $GdCl_3$, D) T_3 e $GdCl_3$. Aumento: 400x. As setas mostram a captação do carbono coloidal.

Tabela II – Captação de carbono coloidal pelas células de Kupffer^a, segundo a condição de tratamento dos animais^b

	Salina	T3
Salina	3,9 ± 0,1 (n=6)	10,5 ± 2,3* (n=6)
GdCl3	2,4 ± 0,4 (n=6)	1,7 ± 0,6 (n=6)

*diferente de todos os outros grupos com $p \leq 0,001$ em todas as comparações (análise de variância, seguida do teste de Bonferroni)

^a Os valores apresentados representam a

média de três medidas independentes da % de área marcada com carbono calculada na área ocupada por células em cortes corados de fígado de rato. Área total medida em cada corte, ~ 0,53 mm².

^b Na primeira linha, as colunas mostram valores referentes aos grupos controle (salina) e tratado (T₃) e na segunda linha, os resultados dos subgrupos que receberam GdCl₃.

4.3. Avaliação Imuno-Histoquímica:

Os animais tratados com T_3 também apresentaram aumento aparente na quantidade de células marcadas pelo anticorpo monoclonal ED1 e ED2 (Figuras 9 e 10). A administração de $GdCl_3$ reduziu ambas as marcações, com efeito quase completo para a marcação para ED2. Não foi observada reação imuno-histoquímica inespecífica nas lâminas de controle negativo.

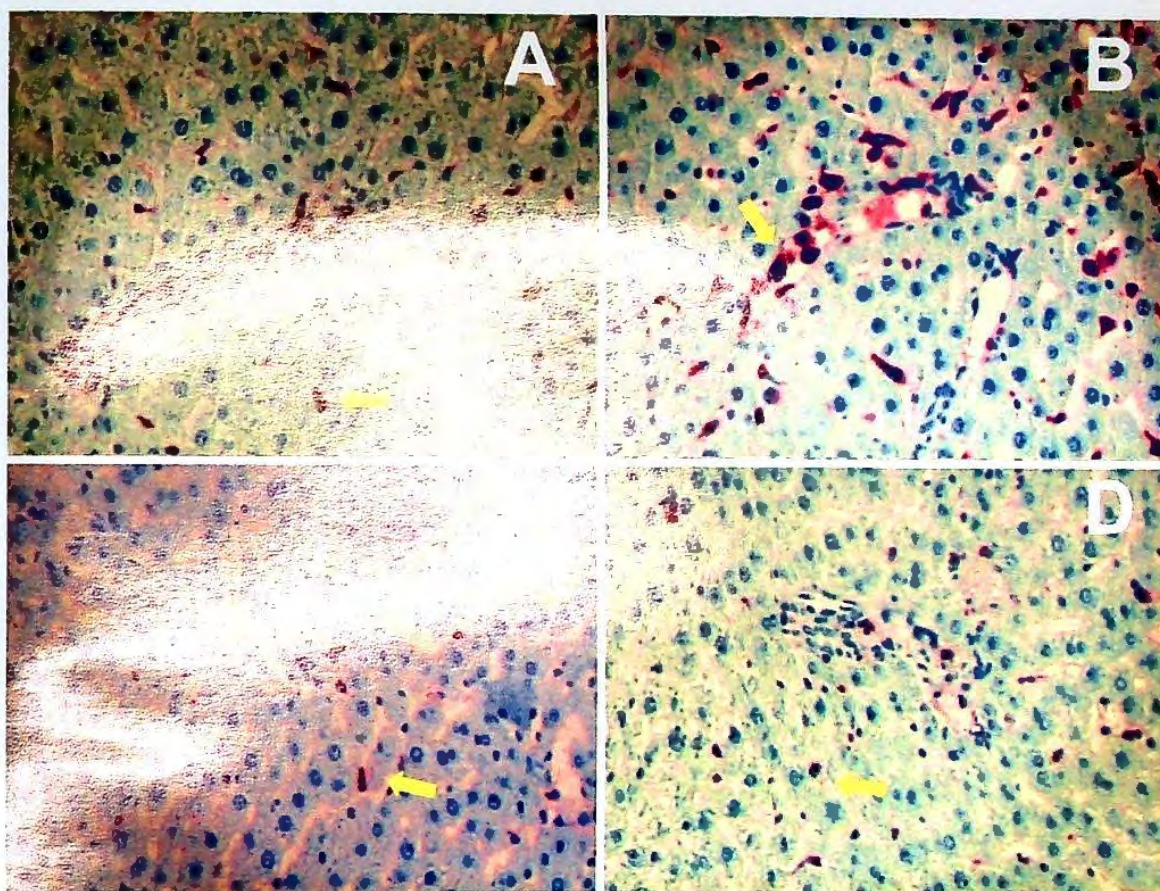


Figura 9 – Fotomicrografia representativa da reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal ED1 em fígado de rato para animais tratados com A) salina, B) T_3 , C) $GdCl_3$, D) T_3 e $GdCl_3$. Contracoloração: hematoxilina. Aumento: 200x. As setas indicam células de Kupffer com reação positiva para ED1.

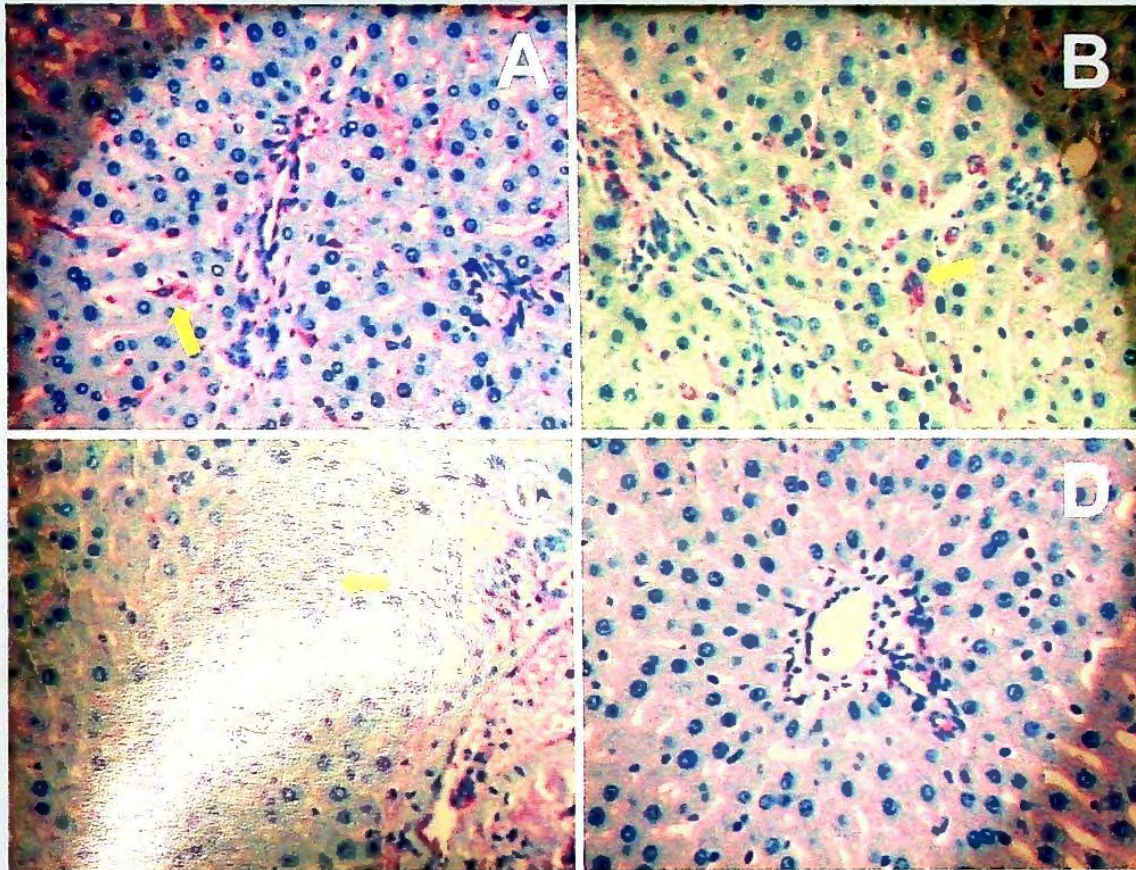


Figura 10 – Fotomicrografia representativa da reação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal ED2 em fígado de rato para animais tratados com A) salina, B) T_3 , C) $GdCl_3$, D) T_3 e $GdCl_3$. Contracoloração: hematoxilina. Aumento: 200x. As setas indicam células de Kupffer com reação positiva para ED2.

4.3.1. População de células ED1 positivas

Foram contadas como células da zona I hepática, as que mantinham uma distância máxima de 322,26 (média $194,78 \pm 46,16$) da luz da tríade portal e como células da zona III, as que mantinham uma distância máxima de 333,04 (média $201,68 \pm 50,37$) da luz da veia centrolobular.

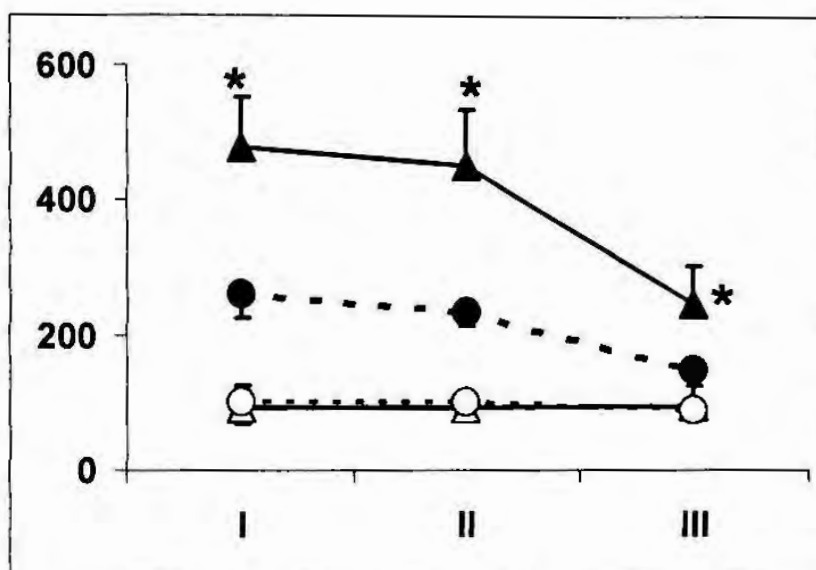


Figura 11 – Densidade celular (células/mm²) da subpopulação ED1 nos grupos controle e tratados com T₃ nas zonas do lóbulo hepático (I, II, III) ▲: animais tratados com T₃, ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com GdCl₃ em cada grupo. *Diferenças estatísticas entre os grupos controles e hipertireoídeos foram analisadas com ANOVA para medidas repetidas, seguido de estabilização de variância por Box-Cox, $\lambda = 1/4$, $p < 0.05$.

43.2. População de células ED2 positivas

Foram contadas como células da zona I hepática, as que mantinham uma distância máxima de 289,29 (média $177,91 \pm 106,91$) da luz da tríade portal e como células da zona III, as que mantinham uma distância máxima de 317,87 (média $180,92 \pm 126,30$) da luz da veia centrolobular.

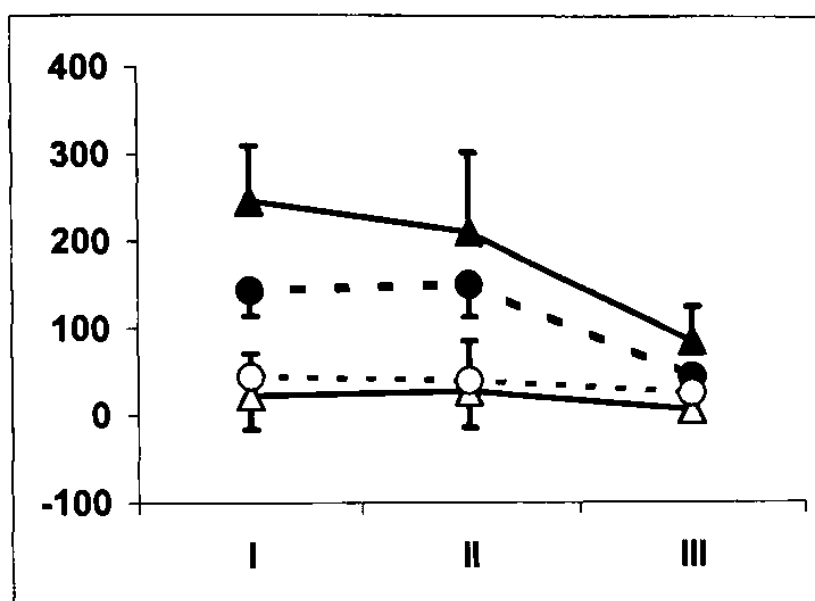


Figura 12 – Densidade celular (células/mm²) da subpopulação ED2 nos grupos controle e tratados com T₃ nas zonas I, II, III do lóbulo hepático. ▲: animais tratados com T₃, ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com GdCl₃ em cada grupo.

4.4.3. População estimada de células ED1+/ED2-

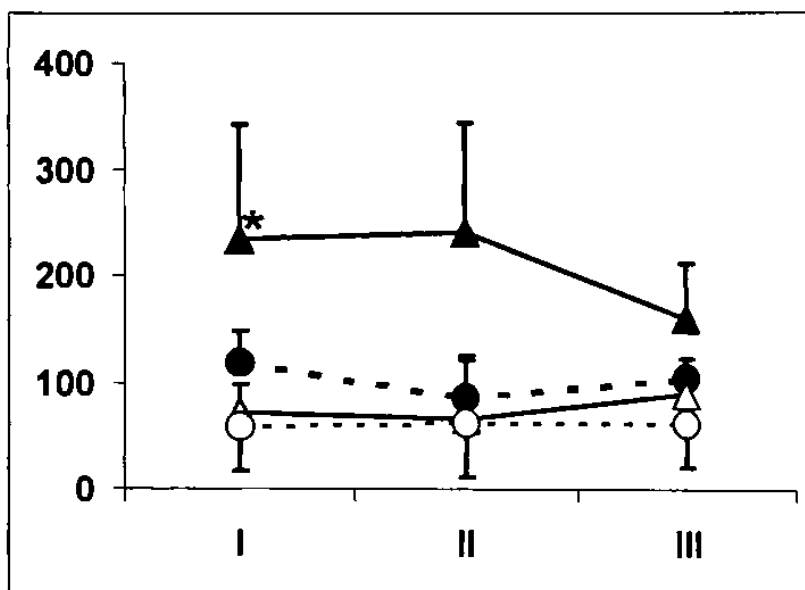


Figura 13 – Densidade celular (células/mm²) da subpopulação estimada de células ED1+/ED2- nos grupos controle e tratados com T₃ nas zonas do lóbulo hepático (I, II, III) ▲: animais tratados com T₃. ●: animais controle. Os símbolos vazios correspondem aos animais tratados com GdCl₃ em cada grupo. *Diferenças estatísticas entre os grupos controles e hipertireoídeos foram analisados com ANOVA para medidas repetidas, seguido de estabilização de variância por Box-Cox, $\lambda = 1/4$, $p < 0.05$.

5. Discussão

O aumento na concentração circulante de T_3 e o aumento na capacidade de retenção de material particulado pelas células de Kupffer foram observados no grupo tratado com T_3 (Figura 8, Tabelas I e II). O aumento de T_3 circulante leva ao aumento da temperatura retal dos animais, segundo FERNÁNDEZ e colaboradores (1985). A calorigênese ocorre por um mecanismo bem estudado e decorre da aceleração na atividade metabólica aeróbica hepática associada à síntese de proteínas desacopladoras da fosforilação oxidativa. Este conjunto de modificações resulta secundariamente em aumento da capacidade oxidativa no tecido hepático (FERNÁNDEZ *et al.*, 1985 e VIDELA, 2000). Hepatócitos são especialmente susceptíveis à toxicidade do T_3 , o aumento da síntese protéica e inchaço turva são as alterações mais precoces relatadas, que se acompanham de algum grau de hipertrofia de células de Kupffer, sugerindo adaptação tecidual (DEL MONTE, 2001). Degeneração gordurosa, necrose centrolobular e cirrose são ocasionalmente encontradas em pacientes não tratados (VIDELA, 2000). Foi descrito aumento na atividade fagocítica de células de Kupffer em indivíduos hipertireoídeos e é proposta uma hiperplasia/hipertofia funcional destas células (TAPIA *et al.*, 1997). A hiperplasia funcional das células de Kupffer associada ao hipertireoidismo experimental foi documentada neste trabalho pelo aumento na captação do carbono coloidal (figura 8 e tabela II). A participação de outros tipos celulares, como as células endoteliais e hepatócitos, foi excluída verificando-se que a captação de carbono coloidal praticamente desaparece nos grupos em que foi feita a eliminação seletiva das células de Kupffer com cloreto de gadolínio. O $GdCl_3$ é um inativador seletivo das células de Kupffer, por isso os animais tratados com $GdCl_3$ foram considerados nas comparações como controles negativos da atividade destas células. Este efeito é dependente do tempo de tratamento e não é permanente, nem letal. A administração intravenosa de $GdCl_3$ aos animais promove um bloqueio da fagocitose pelas células de Kupffer e também uma eliminação maciça dos macrófagos situados na zona periportal dos ácinos

hepáticos. A repopulação do fígado, por macrófagos, começa 4 dias após a injeção do $GdCl_3$ (HARDONK *et al.* 1992 e HUSZTIK *et al.*, 1980).

Apesar do mecanismo do efeito funcional do T_3 sobre as células de Kupffer não estar esclarecido, sabe-se que pode envolver efeitos sobre mais de uma subpopulação de macrófagos residentes no fígado. Para estudar efeitos diferenciais sobre as subpopulações de macrófagos hepáticos, utilizamos a eliminação seletiva de células de Kupffer por cloreto de gadolínio, combinada com a demonstração imuno-histoquímica dessas células pelos anticorpos monoclonais específicos ED1 e ED2.

Os animais do grupo controle (salina-salina), mostraram a presença dos dois tipos de macrófagos distribuídos em zonas I, II, III (respectivamente as regiões periportal, zona intermediária e centrolobular) (figuras 9 e 10). Uma maior densidade de células tanto positivas para ED1, como positivas para ED2 foram encontradas nas zonas I e II (figuras 11 e 12). Confirmando a natureza fagocítica destas células, a população de células positiva para o antígeno ED2 foi praticamente eliminada nos animais do grupo salina-gadolínio (figuras 10 e 12).

Estimando aproximadamente o tamanho da população das células ED1+/ED2- a partir da diferença entre o número de células de Kupffer ED1+ e o número de células ED2+, em cada região (figura 13), verificamos que nossos resultados são consistentes entre si e comparáveis com os de Kono e colaboradores (2002), que mostra que as células ED1+/ED2- são menos susceptíveis do que as ED1+/ED2+ ao $GdCl_3$ e que são as únicas células remanescentes após este tratamento.

A susceptibilidade ao efeito do $GdCl_3$ depende da capacidade da célula de endocitar o $GdCl_3$, administrado por via endovenosa na forma de agregado coloidal. Uma vez no compartimento endossomal-lisossomal celular, o pH ácido promove a dissolução do agregado e são formados íons de $GdCl_3$, que se fixam nestes compartimentos, modificando a função de componentes celulares e levando à morte da célula. A recirculação de endossomos para a membrana plasmática também pode alterar a membrana gradualmente, resultando em desintegração celular (LÁZÁR *et al.*, 1989 e KONO *et al.*, 2002).

As partículas coloidais de $GdCl_3$ são fagocitadas principalmente por células de Kupffer de tamanho grande e intermediário e em menor proporção pelas células de Kupffer menores, devido à sua maior capacidade fagocítica, por isso as células de Kupffer grandes são mais vulneráveis que as pequenas (KONO *et al.*, 2002). Na repopulação hepática inicial por macrófagos, após o uso de $GdCl_3$, as células são pouco vulneráveis. Quando a repopulação é completa, os novos macrófagos mostram a mesma vulnerabilidade das células originais (HUSZTIK *et al.*, 1980 e HARDONK *et al.* 1992).

Em nossos animais, a administração de T_3 induziu a um aumento na população hepática de células mononucleares positivas para o antígeno ED1 (Figuras 9 e 11), mas não nas positivas para ED2 (figuras 10 e 12).

Da mesma forma que os animais do subgrupo salina-gadolínio, os animais tratados com T_3 e $GdCl_3$ mostraram uma diminuição no número de células ED1 e ED2 positivas, nas três regiões do lóbulo hepático. A maioria das células positivas para ED1 encontradas nestes animais, também era constituída por macrófagos pequenos. A hiperplasia de células de Kupffer implica efeitos funcionais que podem depender do estado de ativação celular. O "clearance" silencioso de iniciadores de inflamação, de caráter antiinflamatório é mediado principalmente por macrófagos residentes (WITMER-PACK *et al.*, 1993). Células de Kupffer em estado basal apresentam intensa atividade fagocítica, mas produzem fluxos baixos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e expressam mal receptores de histocompatibilidade (MHC) classe II (BOUWENS *et al.*, 1992, ARMBRUST *et al.*, 1996). Entretanto, podem iniciar a resposta inflamatória, inclusive como células apresentadoras de antígenos (NAITO *et al.*, 1997). A ativação de células de Kupffer resulta em aumento no recrutamento de mononucleares circulantes, na expressão de receptores e na secreção de várias enzimas, eicosanóides, PAF, citocinas, proteínas do Complemento, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e apolipoproteína E (ARMBRUST *et al.*, 1996 e WINWOOD & ARTHUR, 1998). O endotélio sinusoidal e as células de Ito respondem às substâncias liberadas por células de Kupffer ativadas, amplificando o espectro de substâncias liberadas durante a inflamação. Esta ação conjunta desencadeia a síntese de proteínas de

fase aguda, circulantes, e as respostas de regeneração hepática, uma vez que algumas das espécies oxidantes produzidas, como peróxido de hidrogênio, podem ativar fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1) e modificar o equilíbrio entre os sinais de morte e de proliferação nas células do fígado (SEN *et al.*, 1996).

A estimativa da população ED1+/ED2- permitiu analisar o aumento de macrófagos hepáticos que não podem ser considerados formas completamente diferenciadas de células de Kupffer (ARMBRUST *et al.* 1996, SATO *et al.*, 1998 e YAMATE *et al.*, 1999). O valor calculado considera que todas as células ED2+ sejam também ED1+, o que é sugerido pela literatura, mas que nossos dados não permitem confirmar, uma vez que não foram utilizadas técnicas de dupla marcação. Portanto, a expansão da população ED1+/ED2-, observada nos animais tratados com T₃, é igual ou maior que a calculada por nós.

Monócitos recém-migrados são provavelmente ativados durante a travessia pela parede vascular, produzindo espécies reativas (DECKER *et al.*, 1997). O ambiente do sinusóide funciona como estímulo para a proliferação local de células mononucleares precursoras de macrófagos e para sua diferenciação em células de Kupffer. Neste caso, sugere-se que nos animais que receberam T₃, há um desvio da população de macrófagos hepáticos para formas mais jovens, que podem ser menos eficientes do que as células maduras na função de endocitose não inflamatória (ARMBRUST *et al.* 1996). Independente do fato de considerarmos as células pequenas (ED1+/ED2-) como precursores locais de células de Kupffer ou monócitos recém migrados, os resultados mostram que a hiperplasia envolve compartimentos extra-sinusoidais do organismo.

6. Conclusões

O método padronizado para quantificar as áreas marcadas por carbono coloidal e a densidade de células marcadas imuno-histoquímicamente por ED1 e ED2 nos permitiu estudar o comportamento funcional e a distribuição anatômica das diferentes subpopulações das células de Kupffer, frente ao tratamento com T₃ e GdCl₃ em cortes histológicos por meio de um sistema computadorizado.

O aumento na concentração T₃ plasmático circulante foi acompanhado por:

1. Hiperplasia das células de Kupffer
2. Aumento da atividade fagocítica das células de Kupffer, demonstrada pela área marcada por carbono coloidal,
3. Expansão da subpopulação de macrófago hepático ED1+, em especial ED1+/ED2- associada a monócitos recém-migrados e precursores locais de células de Kupffer, segundo a reação imuno-histoquímica com os anticorpos monoclonais ED1 e ED2,

7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, T.; RANA, S.V.S. Oxidative stress by inorganic arsenic: modulation by thyroid hormones in rat. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.135 n.2 p157-62, 2003.
- ARMBRUST, T.; RAMADORI, G. Funcional characterization of two different Kupffer cell populations of normal rat liver. **J Hepatol.**, Amsterdam, v.25, p.518-528, 1996.
- BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A. G. Métodos de coloração de células. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1976. p 81.
- BIOLAC-SAGE, P.; LATRY, P.; DUBROCA, J.; QUINTON, A.; BALABAUD, C. Pit cells in human liver. In: Kim, A, Knook D.L. & Wisse E. **Cells of the Hepatic Sinusoid**. Kupffer Cell Foundation, 1986, v.1, p.415-420.
- BOUWENS, L.; DE BLESER, P.; VANDERKERKEN, K.; GEERTS, B.; WISSE, E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. **Enzyme.**, Basel, v.46, p.155-168, 1992.
- BURGER, D.; DAYER, J.M. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones IL-1 and TNF- α . Production in contact-mediated activation of monocytes by lymphocytes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.966.p.464-473, 2002.
- CANZANELLI, A. D.; RAPPORT, D.; GUILD, R. Control of liver regeneration and nucleic acid content by the thyroid: with observations on the effects of pyrimidines. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.157, p.225-229, 1949.

- CARRERAS, M. C.; PERALTA, J. G.; CONVERSO, D.P.; FINOCCHIETTO, P. V., REBAGLIATI, I.; ZANINOVICH, A.; PODEROSO, J. J. Modulation of liver mitochondrial NOS is implicated in thyroid-dependent regulation of O₂ uptake. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, Bethesda v.281, p.H2282–H2288, 2001.
- COLUMBANO, A.; SHINOSUKA, H. Liver regeneration versus direct hiperplasia **FASEB J.**, Bethesda, v.10, p. 1118-1128, 1996.
- CONEJO, P.; TAPIA, G.; PUNTARULO, S.; GALLEANO, M.; VIDELA, L.A.; FERNÁNDEZ, V. Iron-induced changes in nitric oxide and superoxide generation in rat liver after lindane or thyroid hormone treatment. **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v.119, p.87-93, 2001.
- CROFTON, R.W.; DIESELHOFF DEN-DULK, M.M.C.; VANFURTH, R. The origin, kinetics, and characteristics of the Kupffer cells in the normal steady-state. **J. Exp. Med.** Rockefeller, v.148, n.1, p.,1-17, 1978.
- DAMOISEAUX, J.G.M.C.; DÖPP, E.A.; CALAME, W.; CHAO, D.; MacPHERSON, G.G.; DIJKSTRA C.D. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. **Immunology.** Oxford, v.83, p.140-147,1994.
- DAS, K.; CHAINY G.B.N. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam v.1537 p.1-13, 2001.
- DECKER, K. Biochemistry and functions of eicosanoids. In: Kim, A, Knook D.L. & Wisse E. **Cells of the Hepatic Sinusoid.** Kupffer Cell Foundation, 1986, v.1, p.53-58.

DECKER, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v.192, p.245-261, 1990.

DECKER, K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J. Med.* v. 47(1), p.1-9, 1997.

DECKER, K.; DIETER, P.; HENNINGER, H.; EYHORN, S. BIERMELIN, M. The arachidonoids released by rat kupffer cells in response to phagocytotic stimuli. In: Kim, A, Knook D.L. & Wisse E. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Kupffer Cell Foundation, 1986, v.1, p.65-70.

DEL MONTE, U. Thyroid hormones, acute iron overload and the pathogenesis of cloudy swelling. *Redox Rep.*, Endinburg, v.6 n.2 p. 73-5, 2001.

DIJKSTRA, C.D.; DÖPP, E.A.; JOLING, P.; KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.*, Oxford, v.54, p.589-599, 1985.

FERNÁNDEZ, V.; BARRIENTOS, X.; KIPREOS, K.; VALENZUELA, A, VIDELA, L.A. Superoxide radical formation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology.*, Springfield, v.117, p.496-501, 1985.

FERNÁNDEZ, V.; CONEJO, P.; TAPIA, G. VIDELA, L.A. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide.*, Orlando, v.1, p.463-468, 1997.

FERNÁNDEZ, V.; LLESUY, S.; SOLARI, L.; KIPREOS, K.; VIDELA, L.A.; BOVERIS, A. Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid

hormone-induced liver oxidative stress. **Free Radic. Res. Commun.**, Springfield, v.5, p.77-84, 1988

FERNÁNDEZ, V.; SHIMIZU, K. , BARROS, S.B.M.; AZZALIS, L.A.; PIMENTEL, R.; JUNQUEIRA, V.B.C.; VIDELA, L.A. Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzyme activities, efflux, and turnover. **Endocrinology.**, Springfield, v.129, p.85-91, 1991

FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L.A. Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. **Free Radic. Res. Commun.**, Chur, v.18, p.329-335,1993.

FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L.A.; TAPIA, G.; ISRAEL, Y. Increases in tumor necrosis factor- α response to thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. **Free Radic. Res.**, Yverdon, v.36 n.7, p.719-25, 2002.

GALE, R.P.; SPARKES, R.S.; GOLDE, D.W. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer Cells) in humans. **Science**. Washington, v.201, p.937-938, 1978.

HARDONK, M.J.; DIJKHUIS, F.W.J.; HULSTAERT, C.E.; KOUDSTAAL, J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride elimination and repopulation. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v.52, p.296-302, 1992.

HODEMAKERS, R.M.J.; DAEMEN, T.; SCHERPHOF. Proliferation of rat liver macrophages in vitro. In: Knook D.L. & Wisse E. **Cells of the Hepatic Sinusoid**. Kupffer Cell Foundation, 1993, v. 4 p. 578-580.

HOFFMAN, R.; GREWE, M.; ESTLER, H.C.; SCHULZE-SPECKING, DECKER, K. Detection of different TNF- α -mRNA-synthesizing cells in the LPS perfused rat

liver by non-radioactive in situ hybridization. In: Knook D.L. & Wisse E. **Cells of the Hepatic Sinusoid**. Kupffer Cell Foundation, 1993, v. 4 p. 17-20.

HUSZTIK, E.; LÁZÁR, G.; PÁRDUCZ, A. Electron microscopic study of Kupfer-cell phagocytosis blockade induced by gadolinium chloride. **Br. J. Exp. Pathol.**, London, v.61, p.624-630, 1980.

IDE, M.; YAMATE J, MACHIDA, Y.; NAKANISH, 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. Pathol.**, Liverpool, v. 128, p.41-51, 2002.

JOHNSON, S.J.; HINES, J.E.; BURT, A.D. Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. **J. Pathol.**, London, v.166, p.351-358, 1992.

KONO, H.; FUJII, H.; ASAKAWA, M.; YAMAMOTO, M.; MAKI, A.; MATSUDA, M.; RUSYN, I.; MATSUMOTO, Y. Functional heterogeneity of the Kupffer cell population is involved in the mechanism of gadolinium chloride in rats administered endotoxin. **J. Surg. Res.**, Philadelphia, v.106, p.179-187, 2002.

LASKIN, D. L.; HECK, D. E.; FEDER, L. S.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J.D. Regulation of nitric oxide production by hepatic macrophages and endothelial cells. In: Knook D.L. & Wisse E. **Cells of the Hepatic Sinusoid**. Kupffer Cell Foundation, 1993, v. 4 p. 26-28.

LÁZÁR G.; GALEN V. M.; SCHERPHOF G.L.; Gadolinium choride-induced shifts in intrahepatic distributions of liposomes. **Biochim Biophys Acta.**, Amsterdam, v.1011, p.97-101, 1989..

LORENZI, T.F. Origem das células do sangue. Hemopoese. Citologia das células do sangue e dos órgãos hemoformadores. **Manual de Hematologia**

Propedêutica e Clínica. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 1992, p.1-34.

LUO, D.Z.; VERMIJLEN D.; AHISHALI B.; TRIANTIS V.; VANDERKERKEN K.; KUPPEN P. J.K.; WISSE E. Participation of CD45, NKR-P1A and ANK61 antigen in rat hepatic NK cell (pit cell) mediated target cell cytotoxicity. **World J. Gastroenterol.**, Beijing v.6 n.4 p. 546-552, 2000.

MATSUO, S.; NAKAGAWARA A.; IKEDA K.; MITSUYAMA, M.; NOMOTO K. Enhanced release of reactive oxygen intermediates by immunologically activated rat Kupffer cells. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.59, p.203-209, 1985.

NAITO, M.; HAZEGAWA, G.; TAKAHASHI, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v.39, p.350-364, 1997.

SATO, T.; YAMAMOTO H.; SASAKI, C.; WAKE, K. Maturation of rat dendritic cells during intrahepatic translocation evaluated using monoclonal antibodies and electron microscopy. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v.294, p.503-514, 1998.

SEN, C.K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.**, Bethesda, v.10, p.709-720, 1996.

SHIBATA, Y.; ABIKO, YOSHIMITSU, TAKIGUCHI. Macrophage membrane: Structure and function. In: Harris, J.R. **Blood Cell Biochemistry.** New York and London. 1991, p 209-223.

SHI, J.; KOKUBO Y.; WAKE K. Expression of P-Selectin on endothelia and platelets promoting neutrophil removal by liver macrophages. **Blood.**, New York, v.92, p.520-528, 1998.

- SIMON-GIAVAROTTI, K. A. Estudo do estresse oxidativo hepático induzido por lindano em um modelo de hipertireoidismo experimental. São Paulo. 2001. Nnnp. (Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo).
- SIMON-GIAVAROTTI, K.A.; RODRIGUES, L. RODRIGUES, T.; JUNQUEIRA, V.B.C.; VIDELA, L.A. Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. **Free Radic. Res.**, Yverdon, v.29, p.35-42, 1998.
- TAKEZAWA, R-I.; WATANABE, Y.; AKAIKE, T. Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of kupffer cells. **J. Biochem.**, Tokyo, v.118, p.1175-1183,1995.
- TAPIA, G.; CONEJO, P.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L.A. Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v.106, p.209-214, 1999.
- TAPIA, G.; PEPPER, I.; SMOK, G.; VIDELA, L.A. Kupffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress. **Free Radic. Res.**, Yverdon, v.26, p.267-279, 1997.
- TORRES, S.; DÍAZ, B.; CABRERA J.; DÍAZ-CHICO J.; DÍAZ-CHICO, B. , LÓPEZ-GERRA A. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. **Am. J. Physiol.**, Washington, v.276, p.G155-G163, 1999.
- VENDITTE, P. ROSA, R.; MEO, S. Effect of thyroid state on susceptibility to oxidants and swelling of mitochondria from rat tissues. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.35 n.5 p. 485-94, 2003.

- VENDITTE, P. ROSA, R.; MEO, S. Effect of thyroid state on H₂O₂ production by rat liver mitochondria. **Mol. Cell Endocrinol.**, Amsterdam, v.205 n.1-2 p. 185-92, 2003.
- VIDELA, L.A. Energy metabolism, thyroid calorigenesis, and oxidative stress: functional and cytotoxic consequences. **Redox Rep.**, Endinburg, v.5, p.265-275, 2000.
- WINWOOD, P.J.; ARTHUR, M.J.P. Kupffer cells and endothelial cells. In: Strain, A., Diehl, A.M. **Liver growth and repair**. 5.ed., London: Chapman & Hall, 1998, p. 482-511.
- WITMER-PACK, M.; CROWLEY, M.T.; INABA, K.; STEINMAN, R.M. Macrophages, but not dendritic cells, accumulate colloidal carbon following administration in situ. **J. Cell. Sci.**, London, v.105, p.965- 970, 1993.
- YAMAMOTO, T.; NAITO, M.; MORIYAMA H.; UMEZU, H.; MATSUO H.; KIWADA H.; ARAKAWA M. Repopulation of murine kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.149 n.4, p.1271-1286, 1996.
- YAMATE, J.; KUMAGAI, D.; TSUJINO, K.; NAKATSUJI, S.; KUWAMURA, M.; KOTANI T.; SAKUMA S.; LAMARRE, J. Macropahage populations and apoptotic cells in the liver before spontaneous hepatitis in long-evans cinnamon (LEC) rats. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.120, p.333-346, 1999.
- YAMATE, J.; MAEDA M.; TSUKAMOTO Y.; BENN S.J.; LAITHWAITE, J.E.; ALLAN A.; KANNAN Y.; IDE M.; KUWAMURA, M.; KOTANI T.; SAKUMA S.; LAMARRE, J. Macrophage-like Cell line (HS-P) from a Rat Histiocytic Sarcoma. **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v.124, p.183-191, 2001.