

ANAIIS

ACADEMIA DE MEDICINA DA BAHIA



VOLUME 11
DEZEMBRO/1998

SALVADOR-BAHIA

Fibrogênese hepática*

Zilton A. Andrade

Embora vários tipos celulares residentes no fígado, inclusive os hepatócitos, tenham capacidade para sintetizar os componentes da matriz extracelular, as células perisusoidais armazenadoras de gordura (células de Ito) são os principais elementos responsáveis pela fibrogênese hepática¹. Estudos *in vitro* demonstram que as células de Ito podem ser estimuladas por sobrenadantes oriundos de cultura de células de Kupffer, quando então sofrem modificações fenotípicas para se transformar em miofibroblastos e fibroblastos e para sintetizar ativamente diversos componentes da matriz extracelular². Neste particular, portanto, o fígado dispõe de um eixo celular peculiar (Kupffer-Ito), para gerar a fibrose sob variados estímulos.

Muitos estudos têm sido feitos para se identificar os produtos responsáveis pela estimulação das células de Ito, mas tudo indica que não é só um produto ou um conjunto deles, mas que existe uma fina modulação através de variadas moléculas que, não só estimulam a síntese dos componentes matriciais, mas, ao mesmo tempo e, paradoxalmente, a expressão dos fatores de degradação desta matriz e também dos inibidores de tal degradação. Trata-se assim de um mecanismo com várias etapas, extremamente complexo, mas que aos poucos vai sendo elucidado.

A finalidade da presente apresentação é a abordagem de tópicos sobre a fibrogênese hepática que servem para ilustrar os conceitos emitidos acima.

Ela será feita dentro dos seguintes propósitos:

- a) analisar algumas situações experimentais que acentuam a importância do eixo Kupffer-Ito sobre a fibrogênese hepática

* Material de uma aula ministrada no Curso Brasil-França de Hepatologia, Curitiba, PR, 2-6 de março de 1998

b) analisar aspectos sobre a degradação da fibrose hepática, especialmente alguns detalhes que ainda nos parecem não resolvidos.

O esquema abaixo resume os principais dados sobre as células de Ito:

As Células de Ito (Lipocitos):

Armazenam

Vitamina A

Secretam

Componentes da Matriz Extracelular

Colágenos I, III, IV, V, VII

Glico-proteínas estruturais

Proteoglicanos

MMP e TIMP

Citocinas e Receptores de Citocinas

Modulam a dinâmica sinusoidal

Contração

Endotelina 1-trombina, angiotensina II

Tromboxana A2, prostaglandina F2a

Dilatação

Prostaglandina I2, E2

MMP = Metaloproteinase da matriz

TIMP = Inibidor da metaloproteinase tissular.

FIBROSE SEPTAL

Como esta fibrose se inicia nos espaços de Disse e se continua numa localização peri-sinusoidal, suas relações com as células de Ito são evidentes a partir da sua morfologia ao microscópio ótico.

A fibrose septal é um achado comum em várias doenças crônicas do fígado. Ela é representada por septos fibrosos, longos e finos, que aparecem sulcando o parênquima hepático ao longo da zona 3 do ácino, conectando veias centrais entre si e, às vezes, veias centrais com espaços porta, outras vezes se terminando abruptamente no interior do parênquima.

Embora seja um achado não específico, a fibrose septal assume proeminência em algumas entidades da patologia humana, como a cirrose septal incompleta³ e a hepatite crônica septal⁴. Estas condições permanecem como sendo de etiologia obscura, o que acentua o interesse pela etiologia e patogênese das mesmas.

Recentemente a cirrose septal incompleta foi sugerida como uma nova e importante entidade⁵, que seria reconhecida histologicamente pelas seguintes características: a) septos fibrosos finos e incompletos; b) nodularidade do parênquima; c) hipoplasia de ramos da veia porta; d) vasos finos e dilatados (angiomatóides); e) espaçamento irregular entre espaços porta e veias centrais; f) espessamento da trama reticular e g) dilatação focal dos sinusóides.

FIBROSE SEPTAL INDUZIDA POR SORO DE PORCO

A fibrose septal é bem reproduzida no modelo do rato injetado por 16/20 semanas, duas vezes por semana, com soro total de porco, por via intraperitoneal. Ao fim das injeções, 50 a 75% dos animais desenvolvem uma fibrose septal, que pode se acentuar e chegar a configurar uma cirrose, quando os septos acabam por delimitar nódulos parenquimais por todo o fígado⁶. O importante é que esta fibrose se inicia na zona perisinusoidal, onde as células de Ito proliferam e secretam o excesso de matriz. O elemento do soro que desencadeia o processo está provavelmente ligado à sua fração albumina. A via de administração do soro também tem importância, pois quando se substitui a via peritoneal pela subcutânea a fibrose septal hepática não se forma⁷. É possível que o material injetado no peritônio entre em contato mais prontamente com as células de Kupffer, local onde as

técnicas de imunofluorescência podem demonstrar proteínas do soro de porco no seu citoplasma. Destas células partem provavelmente estímulos, através de citocinas, como a TGF β , que induzem as variadas expressões gênicas nas células de Ito. Sugere-se que a princípio ocorre uma ação das metaloproteinases e que a digestão da pequena quantidade de matriz existente nos espaços de Disse seja o sinal para o início da síntese em maior escala da matriz. O motivo porque a fibrose persiste na zona 3, uma vez que o estímulo se dá em todos os sinusóides, ainda não está bem respondido, mas supõe-se que a baixa concentração de oxigênio nesta zona provavelmente interfere com os processos de degradação e re-absorção do colágeno, favorecendo a sua acumulação.

Dois fatos fundamentais decorrem da observação deste modelo: o primeiro é que a fibrogênese hepática pode se desencadear na ausência de inflamação crônica evidente e/ou de necrose hepato-celular; o segundo é que o processo tem uma base imunológica. Em trabalho recente, Bunchet et al⁸ observaram que 15 ratos Wistar tratados com soro de porco duas vezes por semana, a partir do primeiro dia pós-natal e até 18 semanas mais tarde, ficaram imunologicamente tolerantes às proteínas de tal soro. Desta maneira, eles não desenvolveram fibrose, nem anticorpos contra as proteínas do soro de porco quando repetidamente injetados. Por outro lado, 16 ratos Wistar tratados a partir da oitava semana de vida, e até 10 semanas mais tarde, desenvolveram fibrose em 75%^{12/16}. Também foi demonstrado que, nos ratos do primeiro grupo, não havia interferência com a capacidade geral de formar tecido fibroso, pois eles puderam desenvolver fibrose quando tratados com tetracloreto de carbono durante quatro semanas.

FIBROSE SEPTAL NA INFECÇÃO POR *CAPILLARIA HEPATICA*

Dentro desta ordem de idéias, assume interesse especial o fato de termos verificado que ratos infectados com o helminto *Capillaria hepatica* desenvolvem regularmente fibrose septal⁹. Este

helminto é muito comum nos ratos de esgoto. Ao chegar e se desenvolver no interior do fígado, lá fica retido para sempre, seus ovos não sendo eliminados a não ser depois da morte do hospedeiro. Depois de algumas semanas no rato, os vermes morrem e se desintegram, liberando os ovos no tecido hepático. No local da morte do verme surge a princípio uma reação necro-inflamatória focal, que logo é circundada por uma cápsula fibrosa. No interior da cápsula os detritos dos vermes mortos e os ovos são **paular-tinamente** degradados na presença de uma reação inflamatória granulomatosa, com tendência fibrosante. O curioso é que, justamente quando as lesões inflamatórias focais mostram evidências de involução, aí começam a aparecer os septos fibrosos, que, pouco a pouco, tomam todo o fígado, inclusive áreas bem distantes dos focos parasitários. Durante o tempo de encapsulação, degradação e substituição fibrosa acima citados, os antígenos derivados dos vermes persistem, pois pode se demonstrar através de reação de imunofluorescência. Provavelmente uma situação semelhante acontece com a esquistossomose e a fasciolíase, onde vermes podem vir a morrer e serem seqüestrados em lesões encapsulantes no interior do fígado e onde o processo de fibrose septal também aparece, por vezes de maneira proeminente^{10, 11}.

O modelo de fibrose septal da capilaríase parece ainda mais interessante para os estudos sobre patogenia e quimioterapia do que aquele induzido pelo soro de porco, porque o mesmo se desenvolve em praticamente 100% dos animais, a partir de infecções leves ou moderadas, em torno dos 45 dias da inoculação. Temos especulado que a liberação lenta e continuada de produtos da degradação dos vermes, a partir das lesões encapsulantes focais, contribui para desencadear a fibrose septal, através da mobilização do eixo célula de Kupffer/célula de Ito⁹.

A FIBROSE DO GRANULOMA PERIOVULAR DO *SCHISTOSOMA MANSONI* NO FÍGADO

Vários trabalhos têm acentuado o papel fundamental das células de Ito na gênese da fibrose hepática^{12, 13}. Todos se refe-

rem a processos que afetam o parênquima hepático, não os espaços porta. Por isso nos ocorreu a idéia de verificar se na fibrose associada ao granuloma periovular da esquistossomose, uma lesão localizada no tecido fibroso do espaço porta, ocorreria também a participação das células de Ito. Um marcador conhecido deste lipócito é a desmina. Todavia nas proximidades do granuloma há muita proliferação vascular (endotelial) e o aparecimento de muitos tipos celulares desmina-positivas, dificultando a decisão de quais delas seriam derivadas de células de Ito. Todavia pode-se marcar estas últimas células provocando nos animais uma hipervitaminose A. As células de Ito ficam então abarrotadas de gordura e, quando mobilizadas, ao invés de perder todas as gotículas citoplasmáticas, como normalmente o faz em tais circunstâncias, conserva ainda algumas ao se transformarem em miofibroblastos e fibroblastos. Com este artifício, foi então possível se identificar fibroblastos contendo gordura no citoplasma e estando os mesmos em plena atividade de síntese (rico retículo endoplasmático, com muitas cisternas secretoras) entre as fibras e fibrilas do colágeno, no interior do granuloma periovular¹⁴. Estes dados serviram para ilustrar o fato de que as células de Ito, os principais elementos celulares responsáveis pela fibrogênese no interior do parênquima hepático, podem ter também participação nas lesões fibrosantes que se localizam nos espaços porta.

DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

O conceito atual de fibrogênese está intimamente associado com uma atividade bipolar de síntese e degradação da matriz. As duas forças opostas atuam ao mesmo tempo. Quando predomina a síntese o excesso de matriz se acumula (fibrose); quando predomina a degradação, ocorre a remoção do excesso de matriz (fibrolise). Tem-se dito que a natureza parece ter a tendência em manter sempre uma relação adequada estroma/parênquima. Quando num processo inflamatório crônico ou de outra natureza ocorre uma produção excessiva de matriz, assim que o(s) elemento(s) causador(es) são atenuados ou removidos, passa a predominar o processo inverso de degradação e remoção da

fibrose¹⁵. Os fatores que participam da remoção da fibrose são complexos e aparecem esquematizados no quadro abaixo:

Degradação da Matriz Extracelular (Principais Fatores Envolvidos)

- **Mediadores** – TGF- β , PDGF, INF α e β , TNF.
- **MMP** – Colagenase intersticial (MMP-1), Gelatinase (MMP-2), Estromalisina (MMP-3), Telopectidase (MMP-5).
- **ATIVADORES**: Plasmina, Tripsina, Catepsinas
- **INIBIDORES** – TIMP, A2MG, A1P1

TGF = fator de transformação do crescimento

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas

INF = interferon

MMP = metalo-proteinase da matriz

TIMP = Inibidor tissular da metalo-proteinase

A2MG = alfa2 macroglobulina

A1P1 = alfa1-proteinase1 (alfa1 anti-tripsina)

É interessante notar que tudo o que sabemos sobre os dados acima são conhecimentos que derivam de observações experimentais *in vitro* ou com modelos animais em que a degradação da matriz se processa mais ou menos rapidamente. No quadro mais abaixo aparece uma lista dos principais modelos utilizados.

Acontece que há processos em que a fibrose que se degrada rapidamente, todavia há outros em que a reabsorção da fibrose se faz quase imperceptivelmente, ao longo de meses e anos.

Modelos para o estudo da degradação da Fibrose

- a) Reversão da cirrose por CCL4 no rato (10/20 dias).
 - b) Involução do útero da rata no pós-parto (24-48 horas).
 - c) Metamorfose da cauda do girino (horas)
 - d) Involução do granuloma por Carragenina (18/20 dias).
-

Por tal motivo é que se afirmava até passado bem recente ser a fibrose um processo irreversível. Aliás, ainda hoje, há quem afirme que certas fibroses são reversíveis e que outras são irreversíveis. Realmente, o tecido colágeno amadurece com o tempo. As suas moléculas vão pouco a pouco se unindo através pontes de lisina, formando *cross-linkings*, que tornam o colágeno muito mais resistente à ação das proteinases. Assim, a fibrose de mais recente formação se degrada mais rapidamente, enquanto aquela que persiste por longo tempo se degrada muito lentamente. Os estudos sobre a fibrose portal da esquistossomose hêpato-esplênica contribuíram decisivamente para esclarecer este importante capítulo da biologia da matriz extracelular. Vários trabalhos mostraram que alguns indivíduos com fibrose portal esquistossomótica avançada mostravam uma regressão paulatina da fibrose quando recebiam tratamento curativo para a parasitose, revertendo esta forma grave da doença. O fígado ia diminuindo de tamanho e ficando menos duro, o tamanho do baço voltava ao normal e desapareciam as varizes do esôfago^{16, 17}. Esta transformação todavia leva 2 anos ou mais para ficar evidente. O colágeno do tecido fibroso portal vai sendo paulatinamente degradado, não como nos modelos clássicos, “agudos”, mas, lentamente, “cronicamente”, como revelado através estudos ultra-sonográficos ou mesmo histopatológicos^{18, 19}.

Temos sugerido que parece haver assim dois tipos ou maneiras como a fibrose pode regredir: rápida ou lentamente. Uma boa ilustração deste fato pode ser obtida com o estudo da degradação da fibrose no granuloma esquistossomótico do camundongo que ocorre após a quimioterapia da esquistossomose. Alguns autores diziam que o granuloma periovular era reversível após o tratamento somente quando recentemente formado, isto é, numa infecção de 8-10 semanas, mas que se tornava irreversível nas infecções tardias, de 16-20 semanas (vide 15). Num levantamento semiquantitativo que fizemos do nosso material, os motivos para tais afirmativas aparecem bem claros (Fig. 4). Na figura vemos que em animais com infecção recente (8 semanas) e não-tratados há uma pequena diminuição do vole dos granulomas com o passar do tempo (modulação imunológica). Mas, quando tratados, estes animais exibem um desaparecimento bem evidente

dos granulomas já nos dois primeiros meses após, ficando praticamente curados 4 meses mais tarde. Já na infecção antiga (20 semanas), não há modificações apreciáveis nos dois primeiros meses. Aparentemente, os observadores que estudaram os efeitos da quimioterapia experimentalmente, em animais com infecções prolongadas, não esperavam até 4 a 6 meses para ver os resultados do tratamento. Na realidade, ocorre regressão das lesões 4 a 6 meses depois do tratamento. Todavia, a surpresa maior foi o resultado do exame ultra-estrutural, o qual foi feito com o intuito de se estudar comparativamente as alterações em granulomas hepáticos recentes (infecções de 8-12 semanas em camundongos) e tardias (infecções de 16 a 22 semanas de duração), que estavam num processo de regressão após quimioterapia. Nas infecções recentes pôde-se observar a fragmentação das fibrilas colágenas em porções desiguais, com variedade de calibre e tamanho e a internalização de porções do colágeno no interior de vesículas dotadas de membrana, em fibroblastos e macrófago²⁰. Estas alterações (degradação extracelular do colágeno e internalização de fragmentos do colágeno) são as mesmas classicamente descritas nos modelos experimentais de degradação “aguda” do colágeno. Nos granulomas antigos o aspecto à microscopia eletrônica era inteiramente outro: as fibras colágenas desapareciam em pequenos focos, seja deixando um espaço vazio (“alteração lítica”); ou exibindo a substituição por um material granular, escuro (“alteração eletrônica-densa”)²¹. Estas mesmas alterações são encontradas em pacientes humanos com evidências de involução da forma h pato-esplênica da esquistossomose¹⁹.

Diferenças morfológicas geralmente traduzem diferenças funcionais. Ainda não sabemos se os fatores que atuam na degrada o “aguda” são os mesmos que são efetivos na degrada o “cr nica” do colágeno. Numa primeira tentativa para tal estudo, feita em material de biópsias cirúrgicas em portadores da forma h pato-esplênica da esquistossomose, verificou-se a presença por imuno-histoquímica de MMP-1 e MMP-2 e de seus inibidores, TIMP1 e TIMP2, nos granulomas periovulares ativos dos espaços porta, mas não nos granulomas antigos, involutivos, nem nos focos de rarefa o da extensa fibrose periportal²².

???

Estes últimos dados justificam o quadro seguinte, o qual é apresentado como uma pergunta para estudos futuros

Degradação da Matriz Extracelular (Dois Diferentes Tipos?)

Degradação Aguda

(Representada na maioria dos modelos experimentais)
Ocorre rapidamente, participação evidente de MMPs e TIMPs

Caracterização Ultra-estrutural:

Fragmentação Extracelular do Colágeno
Internalização de Fragmentos de Colágeno

Degradação Crônica

(Não há modelo experimental adequado)
Lenta e prolongada, não há correlação evidente com MMPs e TIMPs

Caracterização Ultra-estrutural

Alteração Lítica
Alteração Eletron-Densa

REFERÊNCIAS

- ¹ DAVIS BH, Kresina TF (1996). Hepatic fibrogenesis. *Clin. Lab. Med.* 16: 361-375.
- ² HAUTEKEETE ML & Geerts A (1997). The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchow's Arch.* 430: 195-207.
- ³ SCIOT R, Staessen D, Van Damme B, van Steenberg W, Fevery J, de Groote J & Desmet VJ (1988). Incomplete septal cirrhosis: Histopathological aspects. *Histopathology* 13: 593-603.
- ⁴ GERBER MA & Vernace S (1974). Chronic septal hepatitis. *Virchow's Arch.* 362: 303-309.

- 5 DHAR A & Chawla YK – Incomplete septal cirrhosis: a new entity?. *Trop. Gastroenterol.* 16; 65-69, 1995.
- 6 ANDRADE ZA. (1991). Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. *Internat. J. Exper. Pathol.* 72: 553-562.
- 7 ANDRADE ZA & Godoy A (1996). Influence of the route of administration of pig serum in the induction of hepatic septal fibrosis in rats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 769, 1996.
- 8 BUNCHET E, Eishi Y & Wake K (1996). Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 23: 381-387, 1996.
- 9 FERREIRA LA & Andrade ZA (1993). *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88: 441-447.
- 10 DARGIE JD, Armour J, Rushton B & Murray M (1974). Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fascioliasis, pp 249-271. In E.J.L Soulsby, *Parasitic Zoonosis. Clinical and experimental studies*. Academic Press, New York.
- 11 ANDRADE, ZA (1988). Pathology of human schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 17-23.
- 12 SCHUPPAN D (1990). Structure of extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin. Liver Dis.* 10: 1-10.
- 13 ROJKIND M & GREENWEL P. (1994). The extracellular matrix of the liver. In IM Arias, JL Boyer, N Fausto, WB Jacoby, DA Schachter & DA Shafritz, *The Liver, Biology and Pathobiology*, pp 843-868. Raven Press, New York.
- 14 BARBOSA Jr., A.A., Pfeifer, U. & Andrade, Z.A.(1993). Role of fat-storing cells (FSC) in schistosomal hepatic fibrosis of mice. *Virchow's Archiv B*, 64: 91-96.
- 15 ANDRADE, ZA (1996). Extracellular matrix degradation in parasitic diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 2273-228.
- 16 BINA JC, Prata A (1983) Regressão da hepatoesplenomegalia pelo tratamento específico da esquistossomose. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 16: 213-218.

- 17 MOHAMED-ALI Q, Doehring-Schwerdtfeger E, Abdel-Rahim IM, Schlake J, Kardoff R, Franke D, Kaiser C, Elsheikh M, Abdalla S, Schafer P, Ehrich JHH (1991). Ultrasonographic investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: reversibility of morbidity seven months after treatment with praziquantel. Am J. Trop. Med. Hyg. 44: 444-451
- 18 DOMINGUES ALC, Lima ARF, Dias HS, Leão GC & Coutinho A (1993) An ultrasonographic study of liver fibrosis in patients infected with *Schistosoma mansoni* in north-east Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg. 87: 555-558.
- 19 ANDRADE, ZA, Peixoto, E, Guerret, S & Grimaud, JA (1992). Hepatic connective tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis. Hum. Pathol. 23: 566-573
- 20 ANDRADE, ZA & Grimaud, JA (1996). Evolution of the schistosomal hepatic lesions in mice after curative chemotherapy. Am. J. Pathol. 124: 59-65, 1986.
- 21 ANDRADE, ZA & Grimaud, JA (1988). Morphology of chronic collagen resorption. (A study on the late stages of schistosomal granuloma involution). Am. J. Pathol., 132: 389-399.
- 22 GOMEZ DE, De Lorenzo M, Alonso DF & Andrade ZA – Expression of collagenases (MMP1 and MMP2) and their inhibitors (TIMP1 and TIMP2) in schistosomal portal fibrosis (manuscrito em preparação).