



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA  
IMUNE CELULAR NA PATOGENIA DA FIBROSE  
SEPTAL HEPATICA EM RATOS**

(Modelo experimental de infecção com o nematoda *Capillaria hepatica*)

**BARBARA CRISTINA ALVES DE ASSIS**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2006**



001563

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE  
CELULAR NA PATOGENIA DA FIBROSE SEPTAL HEPÁTICA  
EM RATOS

(Modelo experimental de infecção com o nematoda *Capillaria hepatica*)

BÁRBARA CRISTINA ALVES DE ASSIS

Orientador: ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

Dissertação apresentada para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Patologia Experimental

Salvador – Bahia – Brasil  
2006



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A848c Assis, Bárbar Cristina Alves de  
Contribuição para o estudo da resposta imune celular na patogênica da fibrose  
septal hepática em ratos; modelo experimental de infecção com o nematoda  
*Capillaria hepática* [manuscrito] / Clarissa Romero Teixeira. - 2006.  
79 f. : il. : 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo  
Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade. Laboratório de.

1. Fibrose hepática. 2. *Capillaria hepatica*. 3. Patogênese. 4. Imunologia.  
I.Título.

CDU 616.995.132:577.27

LEIA

RECIBO  
2006

RECIBO  
2006

"CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE-CELULAR NA PATOGENIA DA FIBROSE SEPTAL HEPÁTICA EM RATOS (MODELO EXPERIMENTAL DA INFECÇÃO COM O nematoda capillaria hepática)".

**BÁRBARA CRISTINA ALVES DE ASSIS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

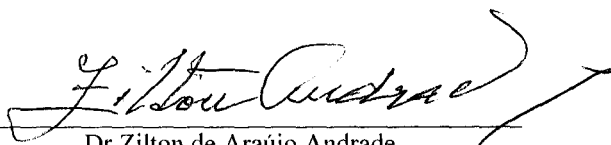
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Christina Maeda Takaya  
Professora Adjunta  
UFRJ



Dr. José Orivaldo Mengel Júnior  
Pesquisador Titular  
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

## DEDICATÓRIA

---

À Deus, a grande luz da minha vida, por todas as provações que só me deram forças. Obrigada por tudo.

À minha mãe, Joselita, pela luta que travou para me dar a oportunidade do estudo, pelo amor e por dedicar a sua vida para os filhos.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Dr. Zilton Andrade, uma das poucas pessoas que conhecemos nesta vida e que podemos procurar imitar. Obrigada pela grande força, orientação, por acreditar em minha capacidade e convivência enriquecedora.

À Dra. Fabíola Cardillo pela simpatia e colaboração na execução da técnica de citometria de fluxo e análise dos resultados. Obrigada pelas sugestões pertinentes e pela paciência.

À Liliane, Záira e Queli pela amizade e grande ajuda nas atividades experimentais, sempre com boa vontade e empenho. Obrigada equipe.

À Jorge Nihei pela amizade e colaboração na execução da técnica de citometria de fluxo e informações importantes sobre detalhes desta técnica.

À Ana Theresa, Carla e Bruno por concederem, gentilmente, materiais experimentais importantíssimos para o prosseguimento desta dissertação. Agradeço especialmente à Ana Theresa pela amizade e grande exemplo a ser seguido.

À Ana Cristina (Tininha) pelas preciosas sugestões sobre a técnica de imunohistoquímica e momentos de entretenimento.

À Elisângela pelo cuidado e manutenção adequada do aparelho criostato e suas excelentes sugestões.

À todos os colegas dos Laboratórios, LAPEX e LACEI, que colaboraram de alguma maneira para a elaboração deste projeto.

Às funcionárias da Pós-Graduação e Biblioteca do CPqGM, Rosália, Lana, Fiscina e Vânia, pela simpatia e colaboração.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	07
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Fibrose septal hepática	13
1.2 Patogenia da fibrose septal	15
1.2.1 Resposta imune do fígado	20
1.2.2 Modelo experimental: <i>Capillaria hepatica</i> Bancroft, 1893	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Inóculo	28
4.2 Animais	30
4.3 Grupos experimentais	30
4.4 Anticorpos	31
4.5 Histologia	33
4.6 Imunohistoquímica	33
4.7 Morfometria	35
4.8 Análise estatística	35
4.9 Citometria de fluxo	36
4.9.1 Obtenção de células do baço	36
4.9.2 Obtenção de células do fígado	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Macroscopia e histologia	40



5.2	Imunohistoquímica	42
5.3	Morfometria	45
5.4	Citometria de fluxo	48
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXO 1	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

APC	Célula apresentadora de antígeno (Antigen-presenting Cells)
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de Carbono
CD	Conjuntos de diferenciação (Cluster of Differentiation)
CEH	Célula Estrelar Hepática
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz/Bahia
CSI	Cirrose Septal Incompleta
DAB	Dimetilaminobenzidina
DMNA	Dimetilnitrosamina
DMSO	Dimetil Sulfoxide
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
H&E	Hematoxilina & Eosina
IL-6	Interleucina-6
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental - CPqGM
NK	Matadoras naturais (Natural Killer)
PBS	Tampão de salina fosfatada (pH 7.2) (Phosphate Buffered Saline)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor)
SBF	Soro Bovino Fetal
t.a.	Temperatura ambiente
TGF-beta	Fator de crescimento e transformação-beta (Transforming Growth Factor beta)

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Aspectos das lesões provocadas pelo verme e seus ovos e do espaço-porta no fígado de ratos infectados com *C. hepatica*. Visão macroscópica mostrando as lesões esbranquiçadas (setas), observar o aumento e escurecimento do fígado (A). Visão microscópica das lesões observadas na figura A (B). Detalhe da lesão em B, onde pode-se notar a diferença de populações celulares (C). Espaço-porta inflamado com septos fibrosos se originando dele, dando-lhe um aspecto estrelar (D). B, C e D coloração H&E. B e D aumento de 100X. C aumento de 400X.

52

Figura 2. Aspectos dos septos fibrosos no fígado de ratos (A,B e C) infectados com o verme *C. hepatica* e (D) tratados com CCl<sub>4</sub>. Septos mostrando suas variações, de mais celulares (seta) a menos celulares (cabeça de seta) (A). Detalhe do septo mostrando hepatócitos na periferia com aspecto apoptótico (setas) (B). Panorama dos septos fibrosos distribuídos pelo parênquima (C). Aspecto do fígado de rato tratado com CCl<sub>4</sub> em estágio inicial de fibrose (D). A e B coloração H&E. C e D coloração picro-sírius vermelho. A e B aumento de 400X. C e D aumento de 100X.

54

Figura 3. Técnica imunohistoquímica para o marcador CD4. Baço de rato normal mostrando a distribuição das células positivas que foi a mesma em animais infectados (A). Fígado de rato normal, mostrando um espaço-porta contendo células positivas menores e arredondadas (setas), células maiores próximas a ele (cabeças de setas) (B) e células alongadas próximas a cápsula (setas) (C). Fígado de rato infectado com *C. hepatica*, evidenciando células positivas, com morfologia alongada, no septo (D). Panorama da marcação, com estas células, localizadas nos septos (cabeças de setas) e próximas a eles (setas) (E). Detalhe da marcação em lesão provocada pelo verme (F). Aumento de 400X.

56

Figura 4. Técnica imunohistoquímica para os marcadores CD4, CD8 $\alpha$  e NKR-P1A. Marcação para CD4, em espaço-porta, no fígado de ratos tratados com CCl<sub>4</sub>, notar a marcação em células fagocíticas (A). Células CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> localizadas na lesão provocada pelos ovos do verme (B) e próximas ao septo fibroso (setas), no fígado de rato infectado (C). Baço de rato infectado mostrando as raras células NKR-P1A<sup>+</sup> (D). Marcação de NKR-P1A no fígado de rato infectado, na lesão (E), no septo (setas) e próximas a ele (F). Aumento de 400X.

58

Figura 5. Gráficos referentes à contagem de células positivas para os diferentes marcadores (morfometria). Células CD4<sup>+</sup>, no baço (A) e fígado (B). Células CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, no baço (C) e fígado (D). Células NKR-P1A<sup>+</sup>, no baço (E) e fígado (F). Legenda: BN - baços dos animais normais; BCh - baços dos animais infectados com *C. hepatica*; FN - fígados dos animais normais; FCh - fígados dos animais infectados com *C. hepatica*; FCCl<sub>4</sub> - fígados dos animais tratados com CCl<sub>4</sub>.

47

Figura 6. Gráficos referentes ao percentual ("gated") de células positivas para os diferentes marcadores (citometria de fluxo). Células CD4<sup>+</sup>, no baço (A) e fígado (B). Células CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, no baço (C) e fígado (D). Células NKR-P1A<sup>+</sup>, no baço (E) e fígado (F). Legenda: BN (baços dos animais normais); BCh (baços dos animais infectados com *C. hepatica*); FN (fígados dos animais normais); FCh (fígados dos animais infectados com *C. hepatica*).

50

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1. Descrição dos anticorpos usados e as diluições empregadas nas técnicas específicas.

## RESUMO

---

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR NA PATOGENIA DA FIBROSE SEPTAL HEPÁTICA EM RATOS (Modelo experimental de infecção com o nematoda *Capillaria hepatica*). **BÁRBARA CRISTINA ALVES DE ASSIS**. A fibrose septal é um achado histológico que ocorre em diferentes doenças crônicas do fígado e sua patogenia ainda é desconhecida. Algumas hipóteses, como alterações na circulação intra-hepática e participação de mastócitos já foram descartadas. Estudos com modelos experimentais vêm comprovando que a resposta imune está envolvida no seu desenvolvimento. Até o momento estes estudos exploraram a resposta imune humoral. Os resultados demonstraram que o nível de anticorpos no soro não tem relação direta com o surgimento da fibrose septal. Todos os trabalhos na literatura sugerem que a resposta imune celular deve ser pesquisada. Este trabalho propõe contribuir, com um estudo inicial, para o entendimento da participação da população celular na formação dos septos fibrosos, utilizando o modelo experimental de ratos infectados pelo nematoda *Capillaria hepatica*. Para este estudo, 19 ratos Wistar albinos adultos, ambos os sexos, foram distribuídos em três grupos: 1) infectados pelo nematoda *C. hepatica* (modelo imunológico); 2) controles normais; e 3) controles com fibrose provocada por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) (modelo hepatotóxico). Foram pesquisadas células  $CD4^+$ ,  $CD8\alpha^+$  e  $NKR-P1A^+$ , no fígado e baço destes animais, utilizando-se as técnicas de citometria de fluxo, imunohistoquímica e morfometria. Os números de células  $CD4^+$  e  $CD8\alpha^+$  aumentaram no fígado dos animais com fibrose septal (infectados pela *C. hepatica*) em comparação aos animais normais ou aos animais tratados com  $CCl_4$ . Somente nos animais infectados, células  $CD4^+$  e  $NKR-P1A^+$  foram observadas nos septos fibrosos, enquanto células  $CD8\alpha^+$  se encontravam próximas a estes. Estes resultados podem indicar uma participação direta destas células na formação dos septos fibrosos, e com isto, fortalecem a idéia de que a resposta imune celular está envolvida na patogenia da fibrose septal.

**PALAVRAS CHAVE:** Fibrose septal, *Capillaria hepatica*, patogenia, resposta imune.

## ABSTRACT

---

ROLE OF THE LIVER IMMUNE-CELL RESPONSE IN THE PATHOGENESIS OF SEPTAL FIBROSIS (Preliminary data with the *Capillaria hepatica* experimental model in rats). **BÁRBARA CRISTINA ALVES DE ASSIS**. Septal fibrosis is an important, common, non-specific finding present in many chronic liver diseases, but its pathogenesis is still uncertain. Earlier suggestions about the role of circulatory disturbances and participation of mast cells in the genesis of septal fibrosis have now been discarded. Experimental studies have suggested an immunological basis instead. But, so far only the immune humoral sector has been explored. Results showed no correlation between septal fibrosis formation and levels of circulating antibodies. The need for investigations on the cellular sector of the immune system has been stressed in recent publications, but no data have yet been published. The present study is a first attempt to explore the participation of some immune cellular factors on the pathogenesis of septal fibrosis of the liver. The numbers and spatial distribution of CD4<sup>+</sup>, CD8α<sup>+</sup> e NKR-P1A<sup>+</sup> cells within the liver and spleen were searched in *C. hepatica*-infected Wistar rats, by means of immuno-histochemistry, morphometry and flux cytometry. Results were compared with those obtained from normal intact control rats, and from rats with liver fibrosis due to carbon tetrachloride. Animals presenting *C. hepatica*-induced septal fibrosis of the liver exhibited a greater number of CD4<sup>+</sup>, CD8α<sup>+</sup> e NKR-P1A<sup>+</sup> cells as compared to the controls. In capillariasis many of these cells were present within the hepatic septa, where the CD4-marked cells frequently disclosed a fusiform phenotype. Although these findings are still very preliminary, they are nevertheless suggestive that the immune cells resident in the liver do participate on the pathogenesis of septal fibrosis associated with *C. hepatica* infection of rats.

Key words – Septal fibrosis, *Capillaria hepatica*, pathogenesis, immune response.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A fibrose septal se constitui em um achado histológico inespecífico, encontrado em diferentes doenças crônicas do fígado, mas sua patogenia ainda é desconhecida. Algumas hipóteses, como alterações na circulação intra-hepática e a participação de mastócitos já foram descartadas. Estudos com modelos experimentais têm sugerido que a resposta imune está envolvida no seu desenvolvimento. Todavia, até o momento os estudos exploraram apenas a resposta imune humoral. Os resultados até aqui obtidos demonstram que o nível de anticorpos no soro não tem relação direta com o surgimento da fibrose septal. Vários trabalhos na literatura sugerem que a resposta imune celular deve ser pesquisada. Este trabalho propõe contribuir, como um estudo inicial, para o entendimento da participação da população celular  $CD4^+$ ,  $CD8\alpha^+$  e  $NKR-P1A^+$  na formação dos septos fibrosos, utilizando o modelo experimental de ratos infectados com o nematoda *Capillaria hepatica*.

## 1.1. Fibrose septal hepática

Este tipo peculiar de fibrose hepática ocorre em ratos, nos modelos experimentais de injeções repetidas de soro heterólogo (geralmente, soro de porco) e de infecção com o nematoda *Capillaria hepatica*. Esta fibrose é caracterizada por septos fibrosos, que conectam espaços-porta entre si e, eventualmente, com veias



*centro-lobulares em uma variedade de combinações. Habitualmente estes septos são originados dos espaços-porta inflamados dando a eles um aspecto estrelar. Esta fibrose é difusa, ou seja, distribuída por todo o fígado. Nos septos, inicialmente, são observadas células inflamatórias, principalmente mononucleares. A população celular vai sendo modificada pela predominância de células mesenquimais, como as células estelares, fibroblastos e miofibroblastos-like (NAKANO, 1986; CASSIMAN et al, 2002). As lesões não se associam com alterações do perfil hepático e nem com hipertensão portal nestes animais (SHIBAYAMA & NAKATA, 1992a). A fibrose septal experimental do rato reproduz por vezes o quadro histológico de uma cirrose, mas não a sua fisiopatologia.*

Este tipo de fibrose é um achado dominante na chamada Cirrose Septal Incompleta (CSI) que ocorre em pacientes humanos. A CSI é uma entidade de etiologia e patogenia ainda desconhecidas. Os achados histológicos são: presença de nódulos de regeneração no parênquima, finos septos incompletos, hipoplasia dos espaços porta, aumento no número de veias centrais, distância anormal entre os espaços porta e veias centrais, acúmulo de reticulina entre as zonas adjacentes de parênquima hipoplásico e dilatação de sinusóides (ZEN et al., 2002).

A CSI tem sido associada a várias doenças, tais como hiperplasia nodular regenerativa, hipertensão portal idiopática e transformação nodular não-cirrótica parcial, bem como, com a progressão e regressão da cirrose de diferentes etiologias. Em muitos casos relatados, o quadro clínico foi silencioso e em pacientes que apresentaram sinais ou sintomas de doença hepática, anemia e trombocitopenia foram os achados mais relevantes (SCHINONI et al., 2004). Resultados

experimentais podem explicar os diferentes quadros clínicos em humanos. SHIBAYAMA & NAKATA, em 1992b, mostraram que a circulação hepática não é alterada em ratos com fibrose septal, no modelo de injeções de soro heterólogo, contudo, quando a fibrose está associada com esteatose ocorre um aumento da pressão portal em comparação com animais controles somente com esteatose. Então, talvez outros fatores associados com o aparecimento da fibrose septal possam agravar o problema e provocar estas divergências na evolução clínica dos pacientes com fibrose septal.

Outro quadro histológico de interesse para o tema presente foi discutido por GERBER & VERNACE em 1974 sob a designação de hepatite septal crônica. Nesta condição, a inflamação portal crônica ocorre com formação de septos fibrosos finos. O infiltrado se limita aos espaços-porta e aos septos. Estes raramente se conectam com veias centrais ou outro trato portal. Os autores ainda mostraram a evolução dos 18 pacientes estudados, onde 09 mostraram um quadro de hepatite agressiva crônica e um evoluiu para cirrose, em 1 ou 2 anos.

## 1.2. Patogenia da fibrose septal

A fibrose hepática resulta da agressão crônica ao fígado levando ao acúmulo de proteínas da matriz extracelular. Durante a fibrogênese não há somente um aumento da quantidade de matriz, como também ocorrem alterações na sua composição (JOHNSON, 1996; FRIEDMAN, 2003). Classicamente, a célula estrelar

hepática (CEH), ou lipócito, ou célula de Ito, tem sido considerada como maior responsável pela produção da matriz extracelular do fígado. Esta célula, em condições especiais, se transdiferencia em miofibroblasto-símile que são caracterizados pela expressão de alfa-actina de músculo liso. Outros tipos celulares também estão envolvidos, como miofibroblastos portais e células originárias da medula óssea (TAN et al., 2002; BATALLER & BRENNER, 2005). A patogênese da fibrose no fígado depende da causa que lhe deu origem. Vários fatores podem levar à fibrose, como fatores biológicos (vírus, bactérias), biliares (colestase prolongada), genéticos, tóxicos (tetracloreto de carbono -  $\text{CCl}_4$ , dimetilnitrosamina – DMN e álcool), nutricionais e imunológicos (modelos de injeções de soro heterólogo e, provavelmente, infecção com o nematoda *C. hepatica*) (TSUKAMOTO et al., 1990). De acordo com a etiologia, a participação celular e a distribuição do tecido fibroso diferem conforme as causas envolvidas (PINZANI, 1999).

A patogenia da fibrose septal ainda não está completamente esclarecida. Nos estudos experimentais iniciais acreditava-se que ocorriam alterações ultra-estruturais no espaço de Disse, proliferação celular e de matriz extracelular amorfa e fibrilar, com posterior formação de membrana basal e colágeno intersticial (ANDRADE, 1991). Contudo, atualmente ficou evidente que a fibrose se origina nos espaços-porta inflamados, com angiogênese, proliferação de células mesenquimais e síntese de matriz extracelular formando septos que dissecam o parênquima hepático até se conectarem com outro espaço-porta ou eventualmente com uma veia centro-lobular passando entre os sinusóides, sem afetá-los (SOUZA, 2003).

Alguns autores levantaram a hipótese de que os septos se formariam como uma resposta adaptativa aos distúrbios da circulação intra-hepática, porém todos os experimentos realizados, através da medição da pressão portal (POPPER & UDENFRIEND, 1970; SHIBAYAMA & NAKATA, 1992a; SHIBAYAMA & NAKATA, 1992b; SHIGA et al., 1998) não detectaram tais distúrbios vasculares. Outros autores acreditavam que a hiperplasia de mastócitos poderia estar relacionada com a patogenia desta fibrose, contudo os resultados com animais mutantes, deficientes de mastócitos, não confirmaram esta possibilidade (SUGIHARA et al, 1999).

Os modelos experimentais de fibrose septal sugerem fortemente que a resposta imune tem um papel primordial na patogenia deste tipo de fibrose. BHUNCHET e colaboradores, em 1996, verificaram que animais “tolerizados” (ratos que receberam injeções de soro de porco desde neonatos) não apresentavam anticorpos anti-soro de porco no soro (ELISA). Portanto, como não tinham uma resposta imunológica, não desenvolviam a fibrose septal. Contudo, em grupos de ratos adultos injetados com soro de porco, apenas uma média de 50% destes desenvolvem a fibrose septal. Os demais apresentam o fígado normal histologicamente. Estes animais que não desenvolvem a fibrose septal, mesmo recebendo as injeções de soro de porco, tanto apresentam anticorpos no soro, como também seus níveis não diferem daqueles dos animais com fibrose. Portanto, estes animais têm uma resposta imune humoral, mas não desenvolvem a fibrose septal.

ANDRADE e colaboradores em 2004 realizaram um estudo misto, utilizando os dois modelos experimentais de fibrose septal. Neste estudo eles “tolerizaram” ratos ao soro de porco e posteriormente infectaram estes animais com o verme *C.*

*hepatica*. Foi observado que após a infecção, os animais apresentaram anticorpos anti-*C. hepatica* e também anticorpos anti-soro de porco, embora tenham sido previamente “tolerizados” para tal antígeno. Estes resultados chamaram a atenção, pois animais “tolerizados” ao soro de porco após infecção por *C. hepatica* voltaram a apresentar anticorpos anti-soro de porco. A hipótese de que poderiam existir fatores em comum entre o soro de porco e os antígenos de *C. hepatica* não foi confirmada pela técnica de Western-blot, onde o soro de ratos infectados com *C. hepatica* não marcou a fita contendo o soro de porco. Levantaram-se, então, outras hipóteses, de que estes animais não estivessem “tolerizados” ou que talvez os anticorpos não tenham sido detectados após o período de tolerização, pois o excesso de antígeno (soro de porco) administrado duas vezes por semana poderia estar consumindo os anticorpos produzidos. Também existe a possibilidade de uma tolerização parcial, pois o soro de porco é uma “sopa” de antígenos e, portanto o animal pode não ter desenvolvido tolerância a alguns carboidratos ou lipídios, mas esteja tolerante a outros componentes do soro que seriam os desencadeadores da fibrose septal, pois nestes animais a fibrose não se desenvolve.

Dados obtidos por nós e ainda não publicados mostraram que os ratos “tolerizados” ao soro de porco, embora não apresentassem anticorpos contra o soro inicialmente, voltaram a apresentá-los após um intervalo maior de observação após o final do tratamento. Estes mesmos animais, mesmo voltando a receber injeções de soro de porco (já adultos) e com resposta imune humoral detectada, todavia não vieram a apresentar fibrose septal.

Outros estudos que também avaliaram a resposta imune humoral e por imunocomplexos demonstraram uma participação parcial ou nula de tais fatores (PARONETTO & POPPER, 1966; BHUNCHET et al., 1996; LEMOS et al., 2003). OLIVEIRA e colaboradores, em 2004, verificaram, no modelo experimental de infecção com o nematoda *C. hepatica*, que com infecções repetidas, os níveis de anticorpos se elevam progressivamente, mas a fibrose septal não é exacerbada, pelo contrário, a partir do quarto mês da primeira infecção os septos começam a regredir mesmo após novas infecções.

A resposta imune celular pode estar desempenhando algum papel na fibrose septal, pois mediadores ou citocinas, como a IL-6 (KAWSER et al., 1998), TGF-beta e PDGF (ROCKEY & CHUNG, 1996) já são ditas como fatores ativadores de células estelares, o componente celular clássico da fibrogênese (MONTEIRO & BOROJEVIC, 1987; ROCKEY & CHUNG, 1996; BRENNER et al., 2000; FRIEDMAN, 2000). Por outro lado, a participação das células estreladas na formação da fibrose septal parece ser mínima (SOUZA, 2003).

A ativação das células envolvidas na fibrogênese depende de um micro-ambiente especial, com células produtoras de citocinas e moduladoras, e provavelmente, estas células ditam a formação da fibrose nessa forma peculiar. Dados recentes indicam que antes das células estreladas se transdiferenciarem, elas estão programadas para recrutar e aderir leucócitos (MAHER, 2001). Contudo, até o momento nenhum estudo específico da resposta celular imunológica, na patogenia da fibrose septal, foi publicado.

### 1.2.1. Resposta imune e fígado

Os fígados do rato e do homem são muito semelhantes quanto à população celular (CASSIMAN et al., 2002). Além das células NK (“pit-cells”) e células T  $NK^+$ , o fígado normal contém um grande número de linfócitos, como diferentes subtipos de células T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$ . O fígado recebe sangue, advindo do intestino, pela veia porta. Este sangue, além de nutrientes, pode conter bactérias e antígenos derivados dos alimentos. A interação com tais moléculas, não-autólogas, pode estimular uma resposta imune no fígado. Isto torna o fígado um órgão diferenciado que necessita sempre estar pronto, com as células adequadas, para realizar mecanismos de controle distintos que determinam se o encontro com o antígeno vai resultar em imunidade ou tolerância (CRISPE, 2003).

As células linfóides do fígado apresentam características e funções diferenciadas das demais células encontradas em outros órgãos (SEKI et al., 2000). Estudos da indução de tolerância demonstraram que linfócitos intra-hepáticos tornam-se tolerantes mais rápido à enterotoxina de *Staphylococcus B* em relação aos linfócitos do baço e linfonodo mesentérico (MATSUI et al., 1997).

A população de células mesenquimais do fígado também vem mostrando particularidades. As células endoteliais do sinusóide hepático têm fenótipo e padrão de produção de citocinas diferente das demais células endoteliais (KNOLLE & GERKEN, 2000). O espaço-porta é dito como um tecido linfóide que coordena e orchestra a direção da resposta ao antígeno (LALOR et al., 2002). A associação da

fibrose com a inflamação levanta a possibilidade do papel de macrófagos e/ou linfócitos aí residentes (POPPER & UDENFRIEND, 1970).

De acordo com dados obtidos no LAPEX (Laboratório de Patologia Experimental – CPqGM) fortes indícios levam a suspeita da participação das células NK do fígado (pit-cell) na fibrose septal em ratos infectados com *C. hepatica* (dados não publicados). Evidências demonstram que o desenvolvimento da fibrose septal pode se tratar de uma resposta celular intrínseca do fígado, pois o surgimento da fibrose em ratos é dependente da via de administração do soro heterólogo. As injeções subcutâneas não induzem fibrose septal nos mesmos (ANDRADE & GODOY, 1996), sendo somente possível a indução desta com injeções intraperitoneais e uma ocorrência de 40 a 70% de fibrose nos ratos. Fato semelhante também acontece com o modelo de infecção com *C. hepatica*, quando injeções intraperitoneais de extratos de fígado de camundongos infectados induzem fibrose em apenas 20% dos ratos, enquanto o modelo tem uma ocorrência de 100% de fibrose nos ratos infectados por via oral, quando os vermes chegam e se desenvolvem diretamente no interior do fígado destes animais (GOTARDO et al., 2003).

Estes dados fortalecem a idéia de uma resposta intrínseca hepática, pois deve existir uma necessidade do fator ou fatores indutores da fibrogênese serem apresentados aos componentes celulares residentes do fígado. Nos animais infectados com *C. hepatica* o contato do nematoda é direto com o fígado e 100% dos ratos desenvolvem a fibrose septal, e nos animais que recebem injeções de soro



heterólogo, a via intraperitoneal torna este contato mais difícil, ocasionando uma porcentagem usual em média de 50%.

### 1.2.2. Modelo experimental: infecção de ratos com o nematoda *Capillaria hepatica* Bancroft, 1893

Vários estudos têm sido realizados com modelos experimentais em ratos (CAMERON & KARUNARATNE, 1963; SHIGA et al., 1997; SANTOS et al, 2001; CASSIMAN et al, 2002) na tentativa de se conhecer melhor a formação da fibrose septal hepática.

No LAPEX trabalhamos com um modelo ainda recente que consiste na infecção de ratos pelo nematoda *C. hepatica* (FERREIRA & ANDRADE, 1993). A infecção se dá pela ingestão de ovos embrionados por via oral. As larvas eclodem no intestino e migram pelo sistema porta-hepático. No fígado, estas larvas amadurecem e se transformam em vermes adultos, machos e fêmeas, quando ocorre a fecundação e posterior oviposição (WRIGHT, 1961). Os ovos permanecem não-embriados no parênquima hepático e daí só são liberados com a morte do hospedeiro e sua desintegração. Os ovos imaturos necessitam de tempo (em torno de 28 dias) e condições ambientais (umidade e calor) para se tornarem embrionados. Se ingeridos ainda imaturos são eliminados nas fezes sem modificações.

Com 18 a 20 dias, época em que as larvas estão chegando à fase adulta, se inicia a formação de septos, raros e focais. A partir daí toda a evolução dos aspectos histopatológicos está de acordo com os da fibrose septal induzida pelo modelo experimental de injeções de soro heterólogo. A exceção é que o fígado dos ratos infectados com *C. hepatica* apresenta nódulos contendo vermes e ovos do nematoda, com um infiltrado maior e fibrose focal intensa nestas áreas.

A fibrose septal já está bem estabelecida em torno de 30 dias de infecção e 100% dos animais a desenvolvem. A oviposição acontece a partir do 21º dia de infecção. Acreditava-se que este fato podia ser importante para a manutenção da fibrose, pois em tempos mais tardios da infecção, a partir do 4º mês, a fibrose inicia uma regressão, justamente quando os ovos estão perdendo a capacidade metabólica, testada anteriormente no LAPEX, através da incapacidade de embrionarem quando postos em condições adequadas para tal (dados não publicados). Com infecções repetidas, e com isto, nova exposição aos ovos, a regressão da fibrose é mantida, enquanto os níveis de anticorpos séricos anti-*C. hepatica* se elevam progressivamente, indicando mais uma vez a falta de correlação entre imunidade humoral e fibrose septal neste modelo experimental (OLIVEIRA et al, 2004).

Estudos para se avaliar a importância do inóculo no desenvolvimento da fibrose septal foram realizados por OLIVEIRA & ANDRADE, em 2001. Os resultados demonstraram que a infecção com 15 ovos embrionados já são suficientes para o desenvolvimento da fibrose nos ratos, mas até com 50 ovos embrionados, esta

fibrose é focal. A partir de um inóculo de 100 ovos embrionados a fibrose septal apresenta-se difusa, como no modelo de injeções com soro heterólogo.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

A fibrose septal ocorre como um achado não-específico em várias doenças crônicas do fígado. É a alteração dominante na chamada cirrose septal incompleta. Sua patogenia não está ainda esclarecida. Existe controvérsia entre os autores, pois alguns acreditam que a fibrose septal hepática seja uma fase inicial da hipertensão portal idiopática (SCIOT et al., 1988; NEVENS et al., 1994; BERNARD et al., 1995) e outros sugerem que seja um estágio de regressão de cirrose (WANLESS et al., 2000; LEMOS et al., 2002). Apoiados em experimentos com ratos tolerizados ao soro de porco, vários autores já chegaram à conclusão de que a fibrose septal tem uma base imunológica (BHUNCHET et al., 1996). Entretanto, os dados referentes aos estudos com a resposta humoral não mostraram relação com o desenvolvimento da fibrose. O setor imune celular não foi pesquisado até o momento neste particular. Daí a necessidade de um estudo sobre o comportamento da população celular imune encontrada no fígado, como uma pesquisa exploratória e inicial, para se avaliar que papel estas células poderiam estar desempenhando na patogenia da fibrose septal que aparece invariavelmente associada com a capilaríase hepática do rato.

### 3. OBJETIVOS

---

#### Hipótese:

Existe diferença no número e distribuição da população celular imune encontrada no fígado dos ratos, com fibrose septal, infectados com o nematoda *Capillaria hepatica*, em comparação com aquela encontrada nos ratos normais ou com fibrose de uma outra etio-patogenia, como aquela provocada por administração crônica do tetracloreto de carbono – CCl<sub>4</sub>.

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar o comportamento da população celular imune no fígado do rato durante a infecção por *Capillaria hepatica*, com o intuito de contribuir para o esclarecimento da patogenia da fibrose septal hepática, que aparece invariavelmente associada com a infecção pelo referido nematoda em ratos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Quantificar células CD4<sup>+</sup>, CD8α<sup>+</sup> e NKR-P1A<sup>+</sup> no fígado e baço de ratos infectados pelo verme *C. hepatica* e controles, normais ou tratados com CCl<sub>4</sub>, com o uso das técnicas de citometria de fluxo (FACS) e morfometria.

- Descrever a distribuição e a morfologia destas células, nos mesmos órgãos citados acima, em animais infectados pelo verme *C. hepatica*, e controles, usando a técnica de imunohistoquímica.
  
- Comparar os dados obtidos, no grupo de animais infectados, com aqueles de grupos controles constituídos por ratos normais intactos e com fibrose hepática provocada pelo tetracloreto de carbono.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. Inóculo

No LAPEX o ciclo de vida do nematoda *C. hepatica* é mantido rotineiramente. Os primeiros ovos deste verme foram obtidos de ratos de esgoto capturados em diferentes bairros de Salvador. Para este estudo, camundongos suíços albinos adultos, criados no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz/Bahia (CPqGM), foram infectados por via oral com a utilização de agulhas de entubação para camundongos, com 150 ovos embrionados advindos de inóculo armazenado a 4°C provenientes do ciclo mantido no Laboratório. Camundongos se infectam, mas não desenvolvem fibrose septal.

Após 30 dias aproximadamente da infecção, os animais foram sacrificados com excesso do anestésico tiopental sódico (Cristália, São Paulo). Os fígados foram retirados e colocados em salina a 0,85%. Estes fígados foram transferidos para um liquidificador comum doméstico contendo salina a 0,85%. Os fígados foram triturados em um ciclo de 3 min na velocidade 2 e 2 min na velocidade 1. Foram distribuídos em cálices de vidro de 500 mL, aproximadamente 50 mL do triturado em cada cálice, sendo que o restante do volume foi completado com salina a 0,85%. Ficaram sedimentando por 1 h e desprezado o sobrenadante. O processo de sedimentação foi repetido por mais 2 vezes. Após este processo, o sedimento (contendo componentes do fígado e ovos não-embrionados do verme) foi distribuído

em placas de Petri de vidro. Estas placas foram colocadas em armário de paredes de vidro, para a passagem da luz solar, localizado em ambiente externo ao Laboratório. Duas vezes por semana as tampas das placas foram abertas e o conteúdo movimentado para oxigenação.

Após 30 a 60 dias, dependendo das condições ambientais (época do ano, pois no verão os ovos embrionam mais rapidamente), os ovos embrionam. A partir de 30 dias das placas postas para embrionar o sedimento foi verificado para a presença e proporções de ovos embrionados e não-embrionados, coletando-se amostras dos sedimentos das placas e colocando-as em lâminas de vidro. Os sedimentos só foram retirados do ambiente externo quando foi observado um número superior de ovos embrionados em relação aos ovos não-embrionados. Não são todos os ovos de *C. hepatica* que embrionam.

Após a verificação de uma proporção adequada (em torno de 70%) de ovos embrionados observada na lâmina, em várias amostras, as placas foram retiradas do ambiente externo, e os sedimentos postos novamente no liquidificador para um novo ciclo do processo de sedimentação, como citado anteriormente. Este novo ciclo é necessário para se evitar o entupimento da agulha de entubação no momento da infecção. Os sedimentos foram distribuídos em tubos (tipo Falcon) de 50 mL. 1 mL deste conteúdo foi colocado em uma lâmina especial (uma adaptação da câmara de Neubauer), que tem a capacidade de 1 mL. Os ovos embrionados foram contados ao microscópio óptico com o auxílio de um contador manual. O inóculo foi definido com o número amostral em 1 mL. Neste estudo o inóculo variou, por tubo, de 900 a



1.200 ovos embrionados por mL. Estes tubos foram armazenados a 4°C até o momento do uso. Este armazenamento é para evitar que as larvas eclodam e se perca a qualidade do inóculo.

## 4.2. Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar albinos adultos, ambos os sexos, que foram acondicionados em caixas, no Biotério do CPqGM, alimentados com ração balanceada (autoclavada) e água à vontade.

## 4.3. Grupos experimentais

Grupo I – Grupo Experimental - Dez animais infectados por via oral com 500 ovos embrionados de *C. hepatica*. Após 30 dias da infecção, os animais foram sacrificados com excesso de tiopental sódico. O lobo esquerdo do fígado e metade do baço de três deles foram retirados e colocados imediatamente em tubos (tipo Falcon) contendo PBS, no gelo. Os demais lobos e a outra metade do baço foram recortados e distribuídos em tubos com formalina a 10% e criopreservados em cubetas de papel alumínio contendo meio OCT (tissue-tek – Sakura, cat. 4583), em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer -70°C até o momento do uso. Os demais ratos tiveram o lobo esquerdo e a metade do baço desprezados. Nos lobos

restantes do fígado e a outra metade do baço foram realizados os mesmos procedimentos acima.

Grupo II – Grupo Controle Intacto. Cinco animais normais. Estes animais foram sacrificados no mesmo dia do grupo anterior. Os mesmos procedimentos realizados no grupo I foram repetidos neste grupo.

Grupo III – Grupo Controle com Fibrose de tipo septal de outra etiologia. Quatro animais tratados por via oral com uma solução de 8% de CCl<sub>4</sub> (Aldrich, cat. 31,996-1) em óleo mineral. O tratamento foi feito duas vezes por semana, durante 16 semanas, conforme protocolo previamente estabelecido (ROSA et al, 1991; DIVINIUS et al, 2005). Os fragmentos de fígado criopreservado em nitrogênio líquido, bem como lâminas de fígado coradas com H&E e picro-sírius foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Theresa Gomes, que faz seu Doutorado no LAPEX. Os animais foram selecionados por terem desenvolvido uma fibrose de grau I e II (de acordo com critérios pré-estabelecidos, não publicados – ANEXO 1), podendo assim, serem comparados ao quadro de fibrose que ocorre no grupo I.

#### 4.4. Anticorpos

Os marcadores celulares selecionados para um estudo inicial e exploratório foram o CD4, CD8 $\alpha$  e NKR-P1A. Os anticorpos, suas diluições e técnicas empregadas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos anticorpos usados e as diluições empregadas nas técnicas específicas.

Nome do anticorpo	Fabricante/ Catálogo	Especificidade	Diluição usada	Técnica(s) empregada(s)
Anticorpo monoclonal purificado anti-CD161a (NKR-P1A) de rato produzido em camundongo	Pharmingen/ 555006	receptor de membrana NKR-P1A	1:100	Imunohistoquímica
			1:50	Citometria de fluxo
Anticorpo monoclonal purificado anti-CD4 de rato produzido em camundongo	Pharmingen/ 550296	receptor de membrana CD4	1:50	Imunohistoquímica
			1:50	Citometria de fluxo
Anticorpo monoclonal purificado anti-CD8a de rato produzido em camundongo	Pharmingen/ 550298	receptor de membrana CD8a	1:20	Imunohistoquímica
			1:50	Citometria de fluxo
Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase	Sigma /A8924	IgG de camundongo	1:50	Imunohistoquímica
Anticorpo anti-IgG1 de camundongo conjugado a biotina	Pharmingen/ 02002D	IgG1 de camundongo	1:50	Citometria de fluxo
Anticorpo anti-IgG2a de camundongo conjugado a biotina	Pharmingen/ 02012D	IgG2a de camundongo	1:25	Citometria de fluxo
Complexo estreptavidina e Cy-cromo	Pharmingen/ 13038A	biotina	1:50	Citometria de fluxo

#### 4.5. Histologia

Os fragmentos de fígado e baço foram imediatamente fixados em formalina a 10% por três dias. Após este tempo, foram colocados em cassete histológico e enviados para o Laboratório de Histopatologia do CPqGM. Neste Laboratório passaram pelas etapas de processamento e inclusão em parafina histológica. Os blocos de parafina contendo os fragmentos foram seccionados em micrótomo. As colorações utilizadas foram H&E e Picro-sírius vermelho (coloração especial para fibras colágenas).

#### 4.6. Imunohistoquímica

O material criopreservado foi retirado do freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  e imediatamente colocados em nitrogênio líquido. Foram selecionados 04 animais de cada grupo, sendo 03 destes, os mesmos selecionados para a citometria de fluxo nos grupos I e II. Foram feitas secções de  $5\ \mu\text{m}$  em criostato a  $-21^{\circ}\text{C}$ . As secções foram colocadas em lâminas bem lavadas e tratadas com solução de 10% de poly-L-lisina (Sigma, cat. P-8920) e fixadas em acetona absoluta gelada por 10 min. As lâminas foram armazenadas no freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  por no máximo 3 dias. No dia dos procedimentos da técnica, as lâminas foram retiradas do freezer e deixadas em temperatura ambiente durante 1 h para equilibrar. As secções foram hidratadas com PBS contendo tween 20 (Sigma, cat. P-7949) a 0,05% por 10 min e duas vezes hidratadas com somente PBS por 5 min cada. Para o bloqueio das ligações inespecíficas foi usado leite

desnatado a 10% diluído em PBS por 1 h. Após o bloqueio foram feitas lavagens com PBS contendo tween 20 (0,05%) e  $\text{NaN}_3$  (0,1%). Os anticorpos primários e suas diluições foram usados de acordo com a tabela 1. O tempo de incubação foi de no mínimo 16 h a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da geladeira e deixadas por 1 h para equilibrar com a temperatura ambiente. Foram feitas novas lavagens. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com uma solução de PBS contendo peróxido de hidrogênio (30%) a 0,3% em dois ciclos de 30 min. Após lavagens as secções foram incubadas com o anticorpo secundário (tabela 1) por 30 min a t.a. Lavagens foram feitas com PBS. Para a revelação da reação foi utilizada uma solução de PBS contendo DAB ("solução-mãe" armazenada a 0°C em uma concentração de 25 mg/mL) a 24%, 10% de DMSO (Sigma, cat. D-5879) e 1% de peróxido de hidrogênio (30%). A revelação foi interrompida com água corrente. O verde-metil (Sigma, cat. M-8884) a 2% diluído em tampão acetato de sódio pH 4.0 foi usado para a contra-coloração por 30 min. As secções foram desidratadas em álcool absoluto (banho rápido) e clarificadas em xilol (2 banhos). As lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá sintético diluído em xilol.

Os controles das reações foram: a) controle negativo, onde apenas o anticorpo primário foi excluído, em secções de baço e no fígado, tanto normal quanto infectado; b) o controle positivo foram secções de baço usados previamente para testar a diluição dos anticorpos.

#### 4.7. Morfometria

A morfometria foi realizada através de sistema de análise de imagem utilizando microscópio de luz (Zeiss Axioskop 2, Alemanha) com sistema de câmera acoplada (JVC TK-128OU, Japão) utilizando software Axiovision 2.0 Zeiss. As lâminas usadas foram obtidas na técnica de imunohistoquímica. Foi estabelecido um quadrante de  $30 \mu\text{m}^2$ , na objetiva de 40X, posicionado no centro da fotomicrografia em tamanho original. Para cada animal foram capturados 8 campos (quadrantes de  $30 \mu\text{m}^2$ ), de forma aleatória através do deslizamento da lâmina na platina do microscópio sem a observação do enquadramento das mesmas. Foram excluídos aqueles campos com áreas do corte contendo artefatos. Nestes campos foram inseridos o quadrante pré-estabelecido e, assim, iniciada a contagem. A contagem de células foi feita manualmente e seguiu alguns critérios. Foram contadas:

- a) As células que estavam dentro do quadrante e excluídas as que estavam fora ou em cima da linha limitante.
- b) As células com marcação evidente.
- c) Células marcadas, com núcleos corados com o verde-metil ou com a marcação bem delimitada.

#### 4.8. Análise estatística

Os dados numéricos obtidos na morfometria das lâminas de fígado, comparando-se os três grupos experimentais, foram analisados com o teste não-

paramétrico Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Os dados das lâminas de baço, comparando-se apenas os grupos I e II, foram analisados com o teste não-paramétrico Mann Whitney. O software utilizado foi o GraphPad Prism 3.0. Os resultados foram considerados significativos com um  $P < 0.05$ , portanto um intervalo de confiança de 95%.

#### 4.9. Citometria de fluxo

Esta técnica foi realizada em dois tecidos diferentes, fígado e baço (de acordo com item 4.3. Grupos experimentais). Cada tecido teve um protocolo específico para a obtenção de células.

##### 4.9.1. Obtenção de células do baço

O baço foi divulsionado com o auxílio de um êmbolo de seringa de 20 mL e peneiras de aço inoxidável com porosidade de 1 mm em placa de petri com PBS (1X). As células assim obtidas foram lavadas 2 vezes em PBS contendo 1% de SBF (soro bovino fetal) e 0,1% de  $\text{NaN}_3$  e centrifugadas à 202 g/5 min/5°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 3 mL de PBS (1X). As células esplênicas foram colocadas no gelo até a coloração com anticorpos monoclonais.

Como descrito, os baços foram divididos em dois grupos: animais normais e outro de animais infectados. Para o procedimento de marcação com anticorpos monoclonais, foi realizada a contagem amostral de células: 10  $\mu\text{L}$  de cada solução contendo células foram diluídos em 500  $\mu\text{L}$  de líquido de Turk em tubos (tipo eppendorf) de 1,6 mL. A seguir, as células ( $2 \times 10^6$ /poço) foram distribuídas em placas de 96 poços (Costar, cat. 3799) e coradas com diferentes anticorpos monoclonais.

As células foram ressuspensas, por agitação no "Vortex" e de imediato foi adicionado em cada poço cerca de 100  $\mu\text{L}$  de tampão de FACS (constituído de PBS, 5% de SBF e 0,1% de  $\text{NaN}_3$ ). Terminado o processo, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais (tabela 1) por 30 min/ $4^\circ\text{C}$ /protegidos da luz. Após esta primeira incubação, as células foram lavadas 3 vezes e ressuspensas em tampão de FACS. As células foram, então, incubadas adicionalmente com soro de cabra a 5% (inativado) por 45 min. A suspensão de células foi, então, submetida à leitura no citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) utilizando como parâmetros: granulidade (SSC) e o tamanho das células (FSC) e o nº de células X FL3-H. Após a definição das barreiras para determinar se as células são positivas ou negativas quanto à presença do marcador (segundo controles) foi realizada a análise estatística pelo programa Cell Quest do mesmo aparelho.

Após determinação da marcação inespecífica nos grupos e para cada anticorpo dos controles, os resultados foram obtidos e apresentados sob a forma de número relativo sobre a janela definida em linfócitos totais. Os controles para as



reações foram: a) controles dos anticorpos secundários, onde apenas estes anticorpos foram adicionados, nos poços de cada “pool”; b) controle do complexo marcado, onde apenas o anticorpo conjugado foi adicionado.

#### 4.9.2. Obtenção de células do fígado

O fragmento do fígado foi obtido, com o auxílio de uma tesoura, em placa de Petri com 5 mL de PBS (1X). Este conteúdo foi transferido para um tubo (tipo Falcon) de 50 mL. Em cada grupo experimental foi analisado o total dos fragmentos (grupo de animais normais e outro dos infectados). O volume foi ajustado para 20 mL com PBS (1X) e centrifugado a 454 g/10 min/5°C, sendo o sobrenadante desprezado. O pellet foi incubado em meio RPMI-1640 (Sigma, cat. R-6504) (contendo 10% de SBF e 0,5% do antibiótico gentamicina (Nova Farma) em uma concentração de 50 µg/mL) contendo 20 mg de colagenase tipo V (Sigma, cat. C-9263) em banho-maria a 37°C por 1 h.

Este material foi peneirado, com o auxílio do êmbolo da seringa, em uma placa de petri e novamente transferido para um tubo (tipo falcon) de 50 mL. O volume foi ajustado para 5 mL com PBS (1X) e centrifugado a 290 g/10 min/5°C. O “pellet” contendo as células hepáticas foi submetido em gradiente descontínuo de percoll 40-80% (Amersham, cat. 17089101). Células ressuspensas em 20 mL de percoll a 80% foram colocadas em tubo (tipo falcon) e em seguida foi colocado o percoll à 40% (v/v). O tubo foi, então, centrifugado à 807 g/30 min/t.a. Com o auxílio

de uma pipeta Pasteur, foram retiradas as células mononucleares da interface após a centrifugação. Estas células foram colocadas em tubos e o volume foi completado para 50 mL com PBS. Este conteúdo foi centrifugado a 454 g/15 min/t.a e ao "pellet" foi acrescentado PBS até ajustar o volume de 25 mL. As células foram novamente centrifugadas a 290 g/10 min/t.a. e ressuspensas em volume final de 1 mL de PBS. Os demais procedimentos de incubação com os anticorpos monoclonais foram iguais aos descritos no item 4.9.1 para a obtenção de células do baço.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Macroscopia e histologia

No grupo I (animais fibróticos infectados), o baço e fígado de todos os animais estavam aumentados de volume. O fígado apresentava macroscopicamente nódulos amarelados distribuídos aleatoriamente em todos os lobos, tanto externamente, quanto na superfície de secção (Figura 1A). O aspecto da superfície destes fígados era rugoso e sua cor mais escura que o habitual. Microscopicamente, os achados no baço foram considerados dentro dos limites normais. O fígado apresentava muitas lesões contendo ovos e vermes de *C. hepatica* (Figura 1B), cercados de um grande infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, hepatócitos com o aspecto apoptótico, substância hialina (fenômeno de Hoeppli) em torno de ovos e vermes em desintegração, e na periferia, células alongadas (Figura 1C).

Os espaços-porta apresentavam-se inflamados, com infiltrado de leucócitos mononucleares, em sua grande maioria, sem invasão da placa limitante. Desses espaços-porta inflamados se originavam os septos fibrosos (Figura 1D). Nessa fase da infecção pelo verme *C. hepatica* (30 dias) foram observados septos com variações de quantidade de células (Figura 2A), sendo possível observar na periferia destes, hepatócitos com o aspecto apoptótico (Figura 2B).

A fibrose foi mais intensa e desorganizada nas áreas próximas às lesões provocadas pelos vermes e ovos. Ocorreu fibrose septal em todos os animais deste grupo e esta se apresentou difusa (Figura 2C). A organização dos septos, muitas vezes, mostrou um aspecto de lóbulo portal (BHUNCHET & WAKE, 1998). A histologia do fígado dos animais infectados com *C. hepatica* estava de acordo com os achados observados, com 30 dias de infecção, em trabalhos realizados no LAPEX.

Os animais do grupo II (animais normais) apresentaram o fígado e baço macroscopicamente e histologicamente dentro dos parâmetros da normalidade. O fígado dos animais deste grupo não mostraram qualquer indício de fibrose.

No grupo III (animais fibróticos controles) havia alguns hepatócitos vacuolizados (esteatose) e numerosas células fagocíticas (contendo material lipídico fagocitados), no espaço-porta, que são achados característicos no modelo de tratamento com CCl<sub>4</sub>. A fibrose apresentou-se em septos, semelhante ao quadro de fibrose septal que ocorre nos modelos experimentais de injeções repetidas de soro heterólogo e de infecção com o nematoda *C. hepatica* (Figura 2D). Nestes animais o quadro histológico de cirrose ainda não estava estabelecido.

## 5.2. Imunohistoquímica

Os fragmentos de fígado e baço criopreservados estavam bem conservados. Os anticorpos primários (Tabela 1) apresentaram uma marcação, em geral, muito satisfatória. A marcação não-específica de fundo (“background”) nas secções foi totalmente nula.

A marcação de CD4, no baço dos animais normais, mostrou que a maioria das células marcadas era, morfológicamente, arredondada, com escassez de citoplasma, pequena e fortemente marcada. Estas células estavam acumuladas principalmente na polpa branca em torno da arteríola central (Figura 3A). Outros tipos celulares também apresentaram marcação, muitas vezes mais fraca. Em alguns animais estas células mostravam uma marcação mais forte, independentemente do grupo experimental. A forma destas células era indefinida e elas apareciam localizadas principalmente na polpa vermelha.

No fígado dos animais normais a morfologia das células CD4<sup>+</sup> foi bem diversificada. Células com a forma não bem definida e citoplasma vasto estavam localizadas nos sinusóides e nas proximidades de espaços-porta (Figura 3B). Células menores com forma arredondada e pouco citoplasma também foram observadas nos sinusóides, sendo mais freqüentemente encontradas no espaço-porta. Células com a forma alongada foram vistas no espaço-porta e próximas à cápsula, contudo mais raras que as demais (Figura 3C). Outros tipos celulares também foram observados fortemente marcados, com a forma estrelar, nos

sinusóides. Na maioria dos animais as células  $CD4^+$  foram observadas no espaço-porta.

No fígado dos animais infectados foi observado um acúmulo de células  $CD4^+$  nos septos fibrosos (Figura 3D) e espaço-porta. As células com a morfologia alongada foram mais numerosas nestes animais e estavam concentradas nos septos. Estas células tiveram a intensidade de marcação variável entre os animais. Em um animal elas estavam distribuídas também nos sinusóides (Figura 3E). Nas lesões provocadas pelo verme e seus ovos estas células eram numerosas e estavam localizadas em torno dos restos do verme, ou seja, no centro da lesão (Figura 3F).

Nos animais tratados com  $CCl_4$  a marcação destas células foi quase restrita a células fagocíticas. Estas células foram observadas no espaço-porta, freqüentemente eram células grandes e com muitos vacúolos (Figura 4A). Nos sinusóides e nos septos, raras células foram encontradas.

O baço dos animais normais apresentou uma população de células  $CD8\alpha^+$  menor em relação às células  $CD4^+$ . As células  $CD8\alpha^+$  estavam localizadas somente na polpa branca em torno de vasos, tanto nos animais normais quanto nos animais infectados. Estas células apresentaram a morfologia arredondada, citoplasma escasso, eram pequenas e fortemente marcadas.

No fígado normal, estas células eram arredondadas, apresentavam citoplasma escasso e eram de tamanhos discretamente diferentes. As células  $CD8\alpha^+$  foram raras e estavam localizadas no espaço-porta e sinusóides. Raramente foram encontradas próximas ao espaço-porta e veias centrais. Nos animais infectados estas células foram mais numerosas nas lesões com ovos e vermes (Figura 4B), raramente no espaço-porta e próximas aos septos fibrosos (Figura 4C). Nos animais do grupo III, tratados com  $CCl_4$ , estas células foram muito raras e observadas no espaço-porta.

No baço e no fígado as células  $NKR-P1A^+$  apresentaram sempre a mesma morfologia e intensidade de marcação. Estas células no baço dos animais normais estavam localizadas por todo o órgão. Algumas vezes formando grupamentos localizados próximos à cápsula e na polpa vermelha. Nos animais infectados esta população diminuiu drasticamente e não foram observados grupamentos (Figura 4D).

No fígado dos animais normais estas células foram encontradas nos sinusóides e próximas ao espaço-porta, veias centrais e cápsula. Um número maior destas células foi observado nas proximidades de grandes vasos. Nos animais infectados ainda apareceram nas lesões (Figura 4E) e nos septos e próximos a eles (figura 4F). As células  $NKR-P1A^+$  nos animais com fibrose provocada pelo  $CCl_4$  foram muito raras e localizadas no espaço-porta.

### 5.3. Morfometria

As células foram contadas dentro dos critérios pré-estabelecidos. A contagem nos baços foi mais laboriosa, principalmente na marcação de CD4, devido ao grande número de células marcadas. Variações intra-específicas e valores extremos observados ocasionaram um desvio padrão acentuado com todos os marcadores no fígado, em determinados grupos.

No baço, não houve variação na média de células CD4<sup>+</sup> entre os grupos, com variação intra-específica no grupo normal (Figura 5A). No fígado dos animais infectados estas células aumentaram acentuadamente, sendo significativa estatisticamente a diferença entre estes animais e os demais grupos. Ocorreu variação acentuada entre os animais do grupo I, contudo os valores são superiores aos encontrados nos outros grupos (Figura 5B).

Células CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> diminuíram no baço dos animais infectados, com um  $P=0,0571$ , muito próximo da significância estatística (Figura 5C). Estas células no fígado dos animais infectados aumentaram em relação aos demais grupos. Este aumento apesar de não ser estatisticamente significativo ( $P=0,0571$ ) foi importante. No grupo I foi observada uma discreta variação intra-específica, sendo que no grupo III um animal representou um valor extremo superior aos demais animais deste grupo, mas, ainda assim inferior à média do grupo I (Figura 5D).



As células NKR-P1A<sup>+</sup> diminuíram bastante no baço dos animais infectados, com um P muito próximo da significância estatística (P=0,0571) (Figura 5E). Não foi possível detectar diferenças na média destas células, no fígado, entre os grupos I e II. Estas células diminuíram nos animais do grupo I e III. No grupo I um valor extremo foi observado e este fez a média no grupo aumentar. Somente foi detectada significância estatística entre os grupos II e III (Figura 5F).

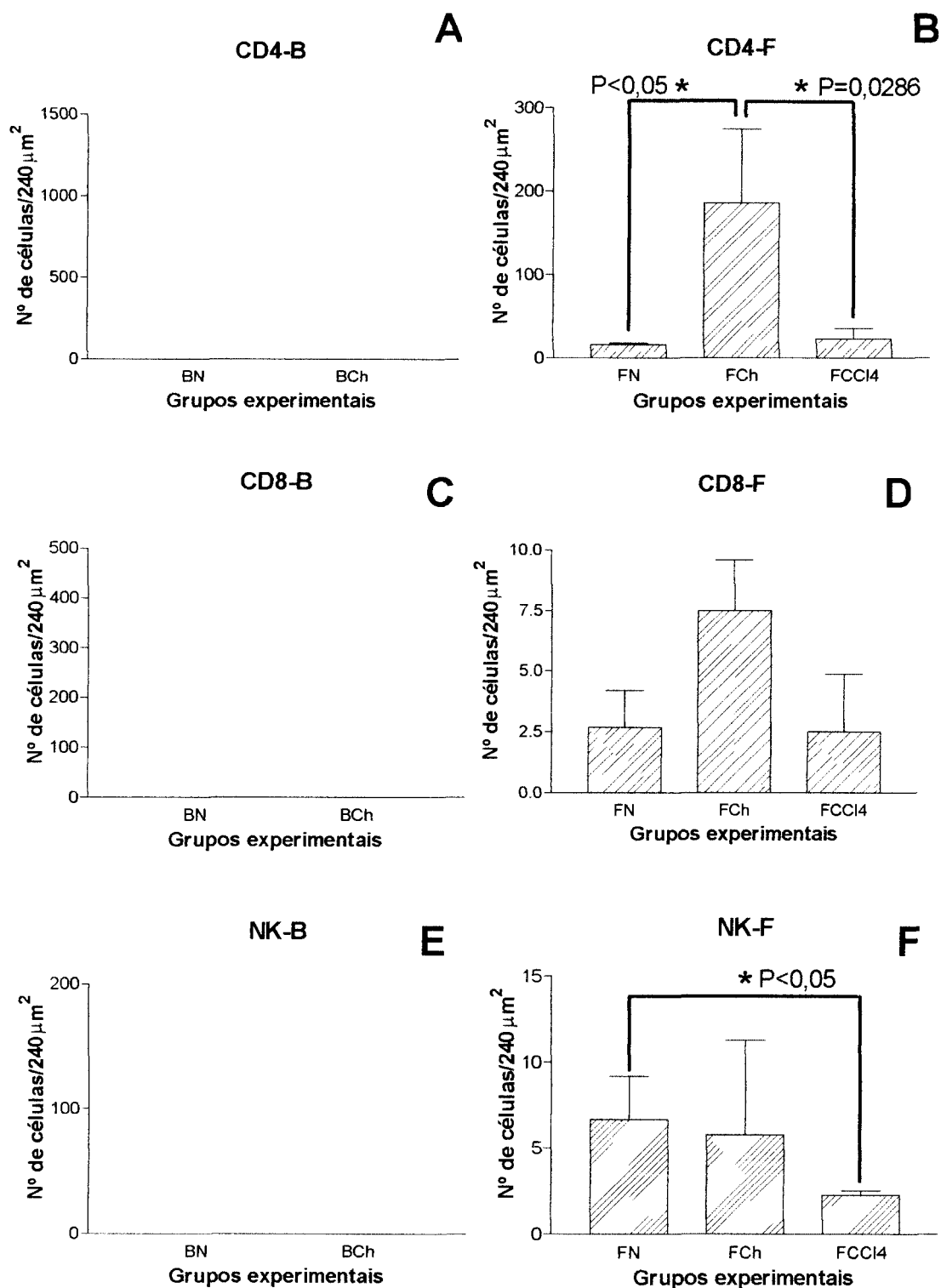


Figura 5. Gráficos referentes à contagem de células positivas para os diferentes marcadores (morfometria). Células  $\text{CD4}^+$ , no baço (A) e fígado (B). Células  $\text{CD8}\alpha^+$ , no baço (C) e fígado (D). Células  $\text{NKR-P1A}^+$ , no baço (E) e fígado (F). Legenda: BN - baços dos animais normais; BCh - baços dos animais infectados com *C. hepatica*; FN - fígados dos animais normais; FCh - fígados dos animais infectados com *C. hepatica*; FCCI4 - fígados dos animais tratados com  $\text{CCl}_4$ .

#### 5.4. Citometria de fluxo

Para esta técnica foram utilizados os valores obtidos em função do total de cada grupo experimental. Os valores proporcionais obtidos referem-se à janela definida no momento da coleta de células pelo aparelho (aquisição, janela definida em linfócitos). O experimento com o fígado dos animais infectados apresentou problemas, pois o material obtido do isolamento de células incluiu vários fragmentos e ovos do verme (dejetos). Assim, a obtenção de células marcadas foi difícil e foram raros os eventos no citômetro de fluxo. O valor percentual utilizado foi deduzido dos valores dos controles da reação (anticorpos secundários, descritos na Tabela 1) do grupo normal, referindo-se tanto ao baço como fígado).

No baço não foi possível observar diferenças no percentual de células  $CD4^+$  entre os dois grupos (Figura 6A). Contudo, no fígado, o valor obtido indicou que a frequência de células  $CD4^+$  pode ter aumentado mais que duas vezes nos animais infectados quando comparados aos controles não-infectados (Figura 6B). A população de células  $CD8\alpha^+$  indicou uma menor frequência de células, no baço dos animais infectados, sugerindo, assim, uma queda dessas células neste grupo em comparação aos animais normais (Figura 6C). Já no fígado, o valor obtido para esta população pareceu ter aumentado em cerca de quatro vezes nos animais infectados (Figura 6D). O valor obtido para o marcador NKR-P1A sugere uma diminuição de mais de uma vez no baço dos animais infectados (Figura 6E). Contrariamente, a população destas células no fígado mostrou uma tendência a estar aumentada nos animais infectados (Figura 6F).

Cumprе salientar que os valores aqui apresentados são indicativos do aumento de células CD4<sup>+</sup>, CD8α<sup>+</sup> e NKR-P1A<sup>+</sup> no fígado dos animais infectados quando comparados aos controles normais. Finalmente no baço, todas as populações celulares estudadas parecem estar reduzidas quando animais infectados são analisados em relação aos normais (com exceção de células CD4<sup>+</sup>, indicativos de não existirem diferenças sobre esta população celular). A análise estatística não pôde ser aplicada nestes resultados, visto que a quantidade de células permitiu apenas a coloração de uma amostra por marcador, em mistura de células de cada grupo (“pool”) e sem contagem de número absoluto por órgão.

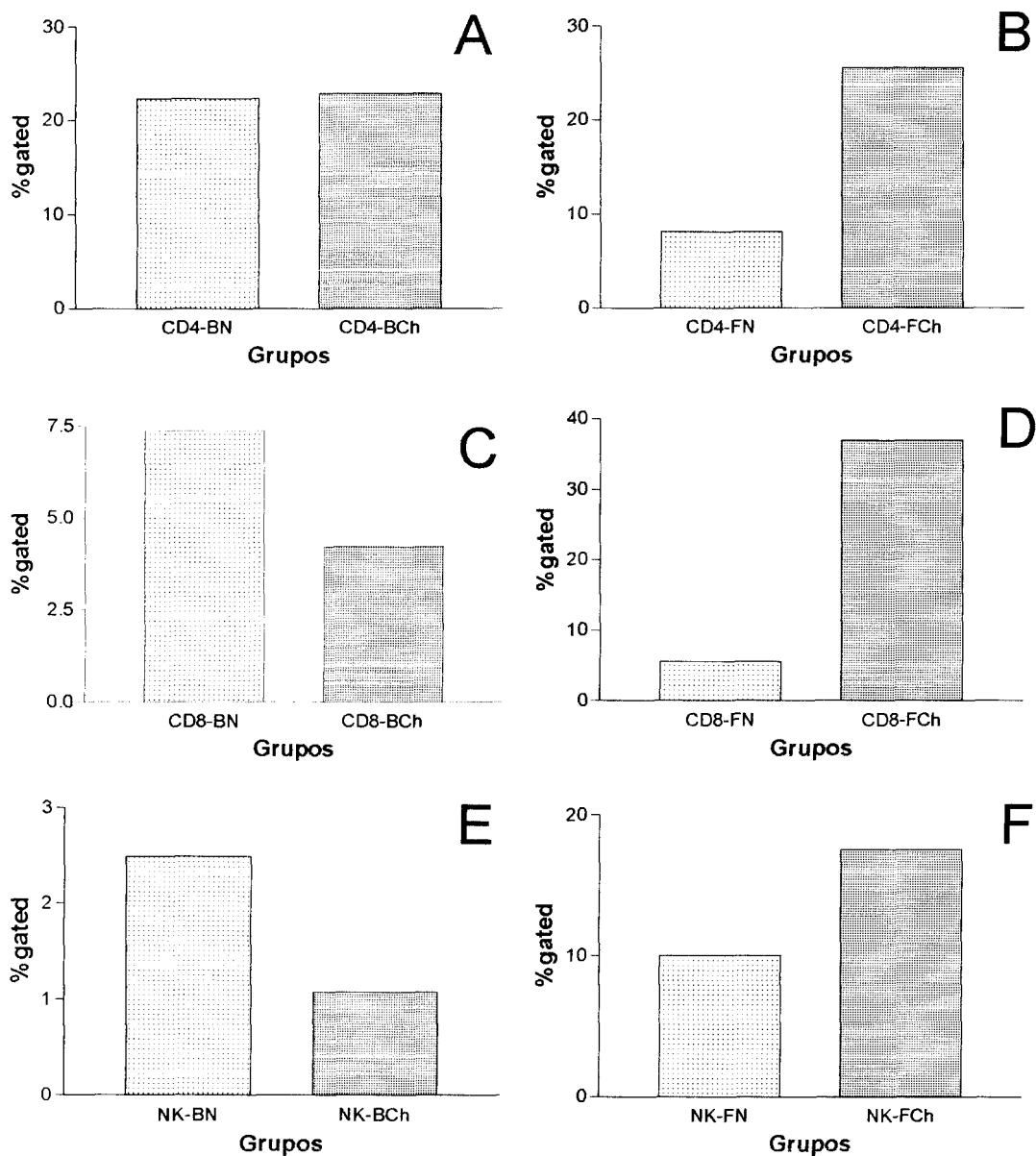


Figura 6. Gráficos referentes ao percentual ("gated") de células positivas para os diferentes marcadores (citometria de fluxo). Células CD4<sup>+</sup>, no baço (A) e fígado (B). Células CD8<sup>+</sup>, no baço (C) e fígado (D). Células NK-RP1A<sup>+</sup>, no baço (E) e fígado (F). Legenda: BN (baços dos animais normais); BCh (baços dos animais infectados com *C. hepatica*); FN (fígados dos animais normais); FCh (fígados dos animais infectados com *C. hepatica*).

**PRANCHA 1**  
**(Macroscopia e Histologia)**

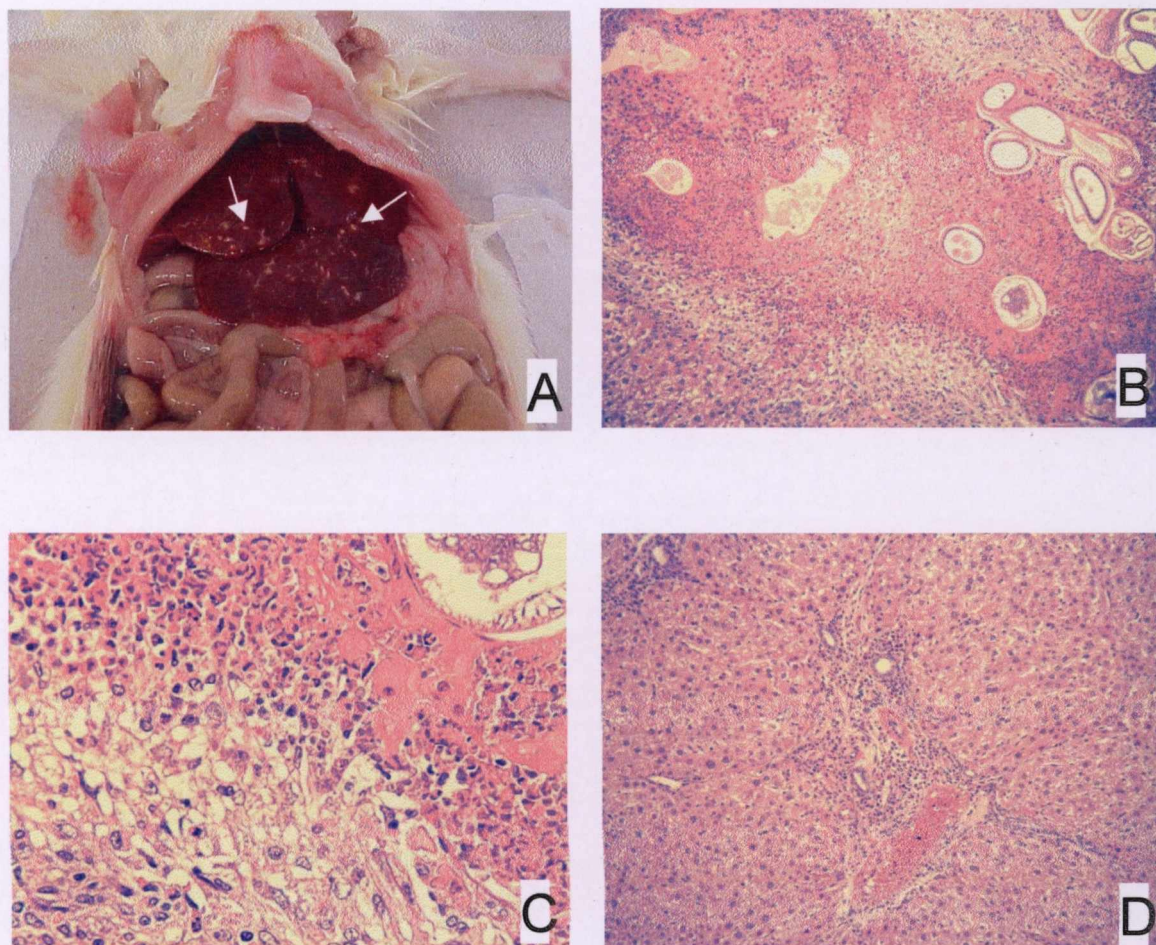


Figura 1. Aspectos das lesões provocadas pelo verme e seus ovos e do espaço-porta no fígado de ratos infectados com *C. hepatica*. Visão macroscópica mostrando as lesões esbranquiçadas (setas), observar o aumento e escurecimento do fígado (A). Visão microscópica das lesões observadas na figura A (B). Detalhe da lesão em B, onde pode-se notar a diferença de populações celulares (C). Espaço-porta inflamado com septos fibrosos se originando dele, dando-lhe um aspecto estrelar (D). B, C e D coloração H&E. B e D aumento de 100X. C aumento de 400X.

**PRANCHA 2**  
**(Histologia)**



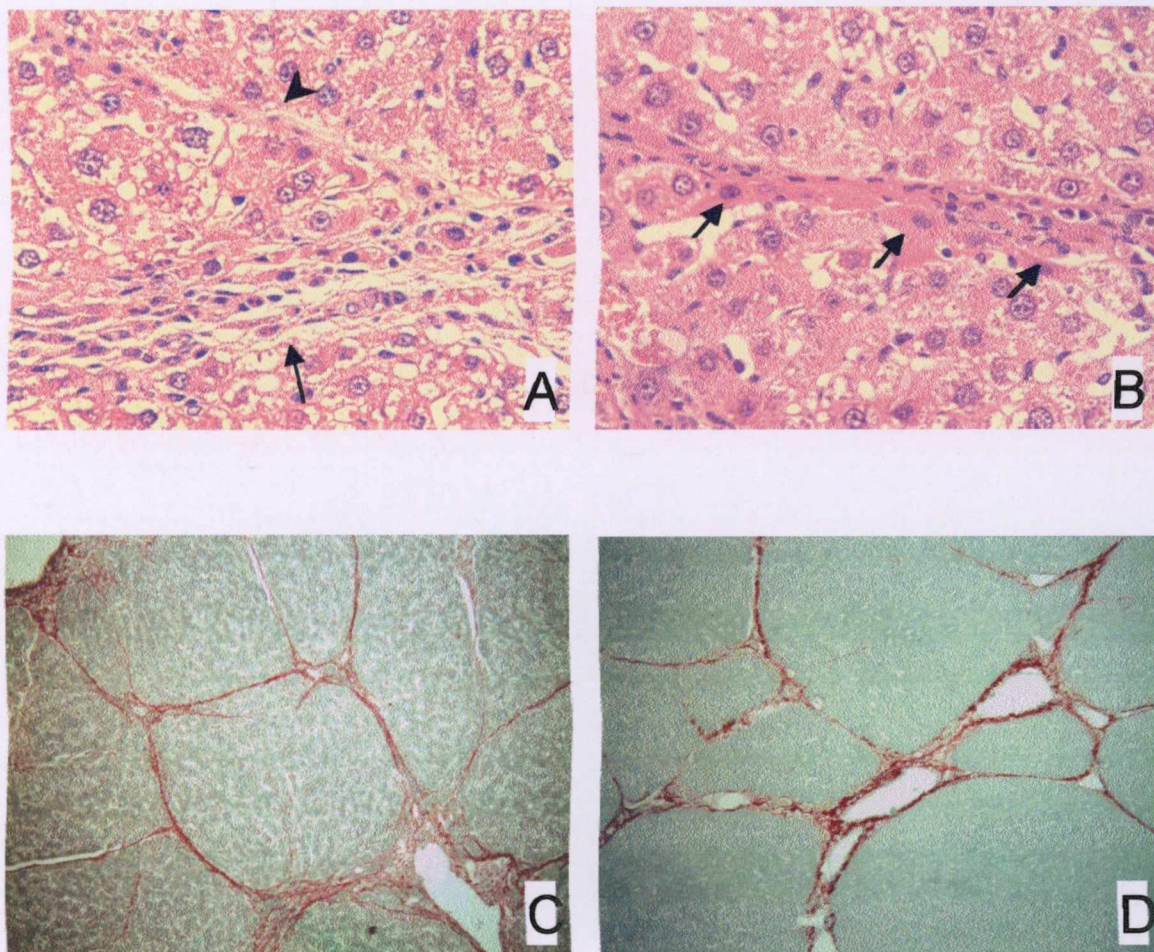


Figura 2. Aspectos dos septos fibrosos no fígado de ratos (A,B e C) infectados com o verme *C. hepatica* e (D) tratados com  $\text{CCl}_4$ . Septos mostrando suas variações, de mais celulosos (seta) a menos celulosos (cabeça de seta) (A). Detalhe do septo mostrando hepatócitos na periferia com aspecto apoptótico (setas) (B). Panorama dos septos fibrosos distribuídos pelo parênquima (C). Aspecto do fígado de rato tratado com  $\text{CCl}_4$  em estágio inicial de fibrose (D). A e B coloração H&E. C e D coloração picro-sírius vermelho. A e B aumento de 400X. C e D aumento de 100X.

**PRANCHA 3**  
**(Imunohistoquímica)**

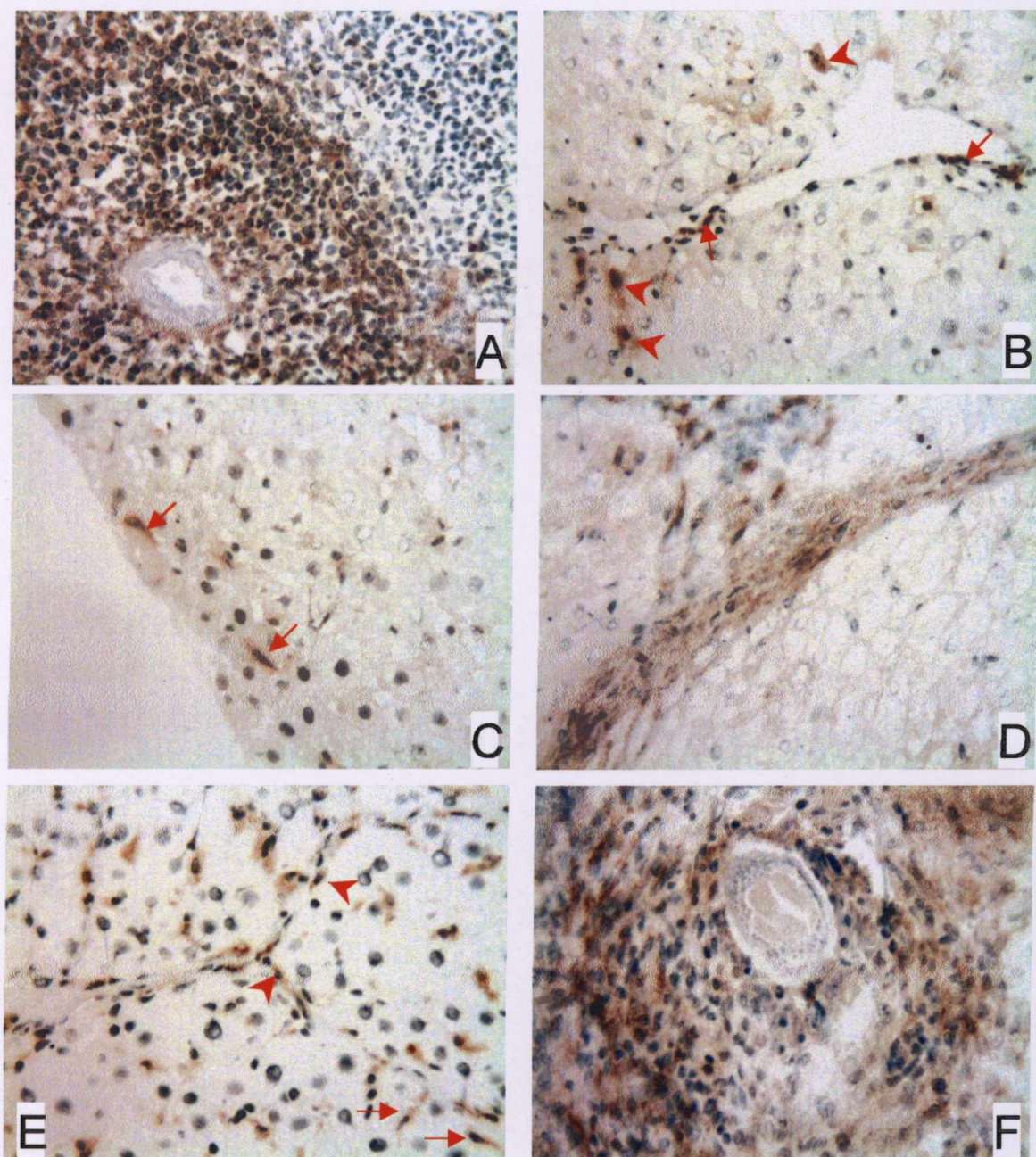


Figura 3. Técnica imunohistoquímica para o marcador CD4. Baço de rato normal mostrando a distribuição das células positivas que foi a mesma em animais infectados (A). Fígado de rato normal, mostrando um espaço-porta contendo células positivas menores e arredondadas (setas), células maiores próximas a ele (cabeças de setas) (B) e células alongadas próximas a cápsula (setas) (C). Fígado de rato infectado com *C. hepatica*, evidenciando células positivas, com morfologia alongada, no septo (D). Panorama da marcação, com estas células, localizadas nos septos (cabeças de setas) e próximas a eles (setas) (E). Detalhe da marcação em lesão provocada pelo verme (F). Aumento de 400X.

**PRANCHA 4**  
**(Imunohistoquímica)**

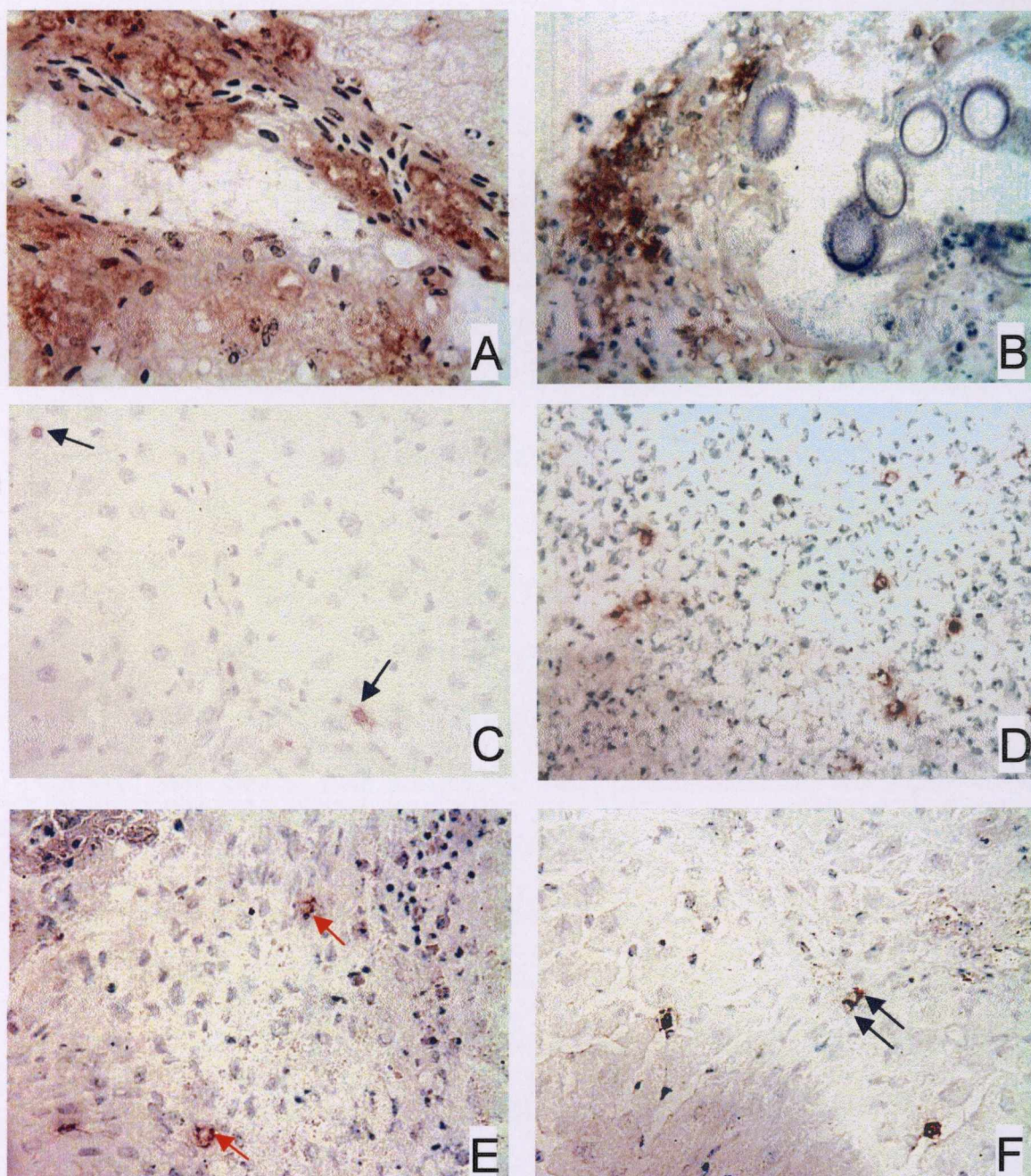


Figura 4. Técnica imunohistoquímica para os marcadores CD4, CD8a e NKR-P1A. Marcação para CD4, em espaço-porta, no fígado de ratos tratados com  $\text{CCl}_4$ , notar a marcação em células fagocíticas (A). Células CD8a<sup>+</sup> localizadas na lesão provocada pelos ovos do verme (B) e próximas ao septo fibroso (setas), no fígado de rato infectado (C). Baço de rato infectado mostrando as raras células NKR-P1A<sup>+</sup> (D). Marcação de NKR-P1A no fígado de rato infectado, na lesão (E), no septo (setas) e próximas a ele (F). Aumento de 400X.

## 6. DISCUSSÃO

---

A quantificação e localização de moléculas encontradas na população celular imune nos ratos infectados com *C. hepatica* (30 dias de infecção), mostraram resultados que podem sugerir que esta esteja participando diretamente na formação dos septos fibrosos no fígado destes animais.

A fibrose encontrada nos animais infectados apresentou-se, como era esperado, de acordo com o inóculo empregado e tempo de infecção estudado. Com este tempo de infecção são encontrados septos numerosos e todas as suas variações. Nos septos mais antigos, ou seja, pouco celulares e ricos em colágeno, as moléculas marcadoras dos tipos celulares estudados não foram observadas. Este resultado era esperado, pois nestes septos a população celular é bem caracterizada, por microscopia eletrônica, como células mesenquimais da família dos fibroblastos (ANDRADE, 1991; POPPER & UDENFRIEND, 1970; SOUZA, 2003). Os septos mais recentes apresentaram uma população importante de células CD4<sup>+</sup> e raras células NKR-P1A<sup>+</sup>. A presença destas células nos septos fibrosos pode sugerir a participação direta das mesmas e seus produtos na formação da fibrose septal.

Os marcadores de moléculas de superfície usados neste estudo, CD4, CD8 $\alpha$  e NKR-P1A, demonstraram alterações importantes nos animais infectados em comparação aos animais normais e aos tratados com CCl<sub>4</sub>. Os resultados observados entre as técnicas usadas não tiveram grandes divergências. A diferença

observada foi com o marcador NKR-P1A no fígado dos animais infectados. Esta discordância de resultado foi devido a variação intra-específica que foi observada.

Os resultados da morfometria mostraram que no baço não há diferença estatisticamente significativa ( $P=0,4000$ ) entre os animais normais e infectados. Na citometria de fluxo este resultado foi confirmado.

Com o marcador CD8 $\alpha$ , ainda no baço, ocorreu uma diminuição no número de células positivas, na morfometria, apesar da análise estatística não ser significativa ( $P=0,0571$ ), mas com um valor muito próximo da significância. O valor de P, neste caso, sugere fortemente que o número de animais no grupo ( $n=4$ ) está interferindo na significância estatística deste resultado, e que talvez o acréscimo de animais provavelmente resultaria em um  $P<0,05$ . As células NKR-P1A<sup>+</sup> também diminuem nos animais infectados, contudo o P não é significativo ( $P=0,0571$ ) como no caso anterior. Os resultados para os dois últimos marcadores foram confirmados pela técnica de citometria de fluxo.

A purificação de células dos fígados dos animais infectados apresentou muitos detritos após a passagem pelo gradiente de percoll. Provavelmente estes detritos resultaram de células mortas e restos de vermes e ovos que, por algum motivo, permaneceram na interface do percoll (80 e 40%). Estes depósitos, provavelmente, provocaram a marcação inespecífica acentuada, vista nos controles da reação, no “pool” dos fígados dos animais infectados. Apesar dos problemas com a técnica de citometria de fluxo neste grupo, os resultados parecem não ter sido

prejudicados. Apesar do uso de “pool” dos grupos para a citometria, mesmo os animais sendo “out-bred”, a variação entre os animais foi revelada pela morfometria e a tendência de aumento ou diminuição foi confirmada, apesar dos valores extremos, que algumas vezes variaram para mais e outras vezes para menos.

A morfometria no fígado revelou um aumento de células CD4<sup>+</sup> e CD8α<sup>+</sup> nos animais infectados em relação aos demais grupos, normais e tratados com CCl<sub>4</sub>. A variação neste grupo existiu, para os dois marcadores, mas os valores foram sempre superiores aos dos controles. Apesar da forte tendência de aumento no número de células positivas nos animais infectados, somente as diferenças entre as médias dos grupos na marcação de CD4 foi estatisticamente significativa.

Apesar do teste Kruskal-Wallis apresentar um P=0,0458 com o marcador CD8α não foi possível detectar diferenças significativas entre os grupos, com o pós-teste de Dunn. Realizando o teste de Mann Whitney, comparando-se os grupos I e III, este revelou um P=0,0571, muito próximo da significância estatística. Portanto, o número de animais novamente pode ter interferido. Entre os grupos controles não foram observadas diferenças, pois parece que não há alteração nas médias para os dois marcadores entre estes grupos. A citometria de fluxo confirmou os resultados acima.

As células NKR-P1A<sup>+</sup> tendem a diminuir nos animais com fibrose, tanto os infectados quanto os tratados com CCl<sub>4</sub>. A diferença entre os grupos I e II não ficou muito relevante, contudo retirando-se deste grupo o valor extremo, o gráfico mostra



uma diminuição importante de células NKR-P1A<sup>+</sup>. Entre os grupos I e III a diferença não é estatisticamente significativa, contudo o  $P=0,0571$  está muito próximo da significância. Na citometria de fluxo o resultado mostra uma tendência de aumento destas células nos animais infectados. Contudo, este resultado pode ser explicado pelo valor extremo (representado por um animal no grupo I que apresentou um grande número de células NKR-P1A<sup>+</sup>), sendo este um dos animais utilizados para esta técnica.

Nos animais com fibrose provocada pelo CCl<sub>4</sub> não foram obtidos valores para o baço, e apenas a técnica de morfometria foi empregada. No fígado destes animais existiu sempre uma diminuição de células positivas para todos os marcadores em comparação aos animais infectados (grupo I). Este grupo só apresentou diferença estatística com a média do grupo normal quando se utilizou o marcador NKR-P1A. Nos demais marcadores a tendência da média desse grupo era a de manter-se igualada a média observada no grupo normal.

A maioria das células marcadas tendia a diminuir o seu número no baço e a aumentá-lo no fígado dos animais infectados. A exceção foi o marcador CD4, no baço, onde não foi possível observar diferenças, com as médias estando muito próximas em ambas as técnicas. Outra exceção, na morfometria, foram as células NKR-P1A<sup>+</sup> que diminuem em ambos os órgãos, apesar da citometria de fluxo mostrar o contrário. Os dados, em geral, sugerem a migração de células do baço para o fígado, devido à diminuição de determinada população neste e aumento no fígado nos animais infectados. Essa migração pode indicar a participação de células

do baço na fibrose no fígado. Contudo, dados recentes no LAPEX mostraram que ratos esplenectomizados e posteriormente infectados com *C. hepatica* desenvolvem a fibrose septal como nos controles, constituídos por ratos infectados e não esplenectomizados (dados não publicados).

Muitos são os trabalhos que discutem a população celular do fígado e suas funções. O fígado possui células que são residentes e bem conhecidas, como células estreladas, "pit cell" (células NK) e células de Kupffer (macrófagos). Contudo, muitos subtipos de células do sistema imune são encontradas, como  $T\text{ NK}^+CD8^+$ ,  $T\alpha\beta\text{ NK}^+$ ,  $T\gamma\delta\text{ NK}^+$ ,  $T\gamma\delta\text{ CD4}^+$  e  $CD4^+CD25^+$  (MATSUI et al., 1997; KLUGEWITZ et al., 2004) e suas funções no fígado, sadio ou doente, não estão bem esclarecidas. A atenção voltada para a imunologia do fígado é notória (DOOLITTLE et al., 1987; MOSNIER et al., 1996; LUO et al., 1999; SEKI et al., 2000; LUO et al., 2001; MACKAY, 2002; CRISPE, 2003; EVERETT et al., 2003). A habilidade desse órgão em reconhecer antígenos e promover imunidade ou tolerância é um fato muito interessante. Assim sendo, o tipo celular que apresenta e reconhece determinado antígeno é a chave para o entendimento dos processos hepáticos. Estudos com subtipos celulares imunes demonstraram que o fígado normal de camundongos é rico em células  $CD4^+$  de memória e que grande parte da população de linfócitos encontrada no fígado é recrutada para lá. Ainda, esta população é dinâmica e migra depois para os linfonodos (KLUGEWITZ et al., 2004).

O aumento do número de células imunocompetentes no fígado dos animais infectados e a manutenção do número normal nos animais tratados com  $CCl_4$ ,

fortalecem a idéia de que a resposta imune celular esteja envolvida na formação da fibrose septal no modelo experimental de infecção com o nematoda *C. hepatica*, apesar de não termos dados da citometria de fluxo dos animais do grupo III (animais tratados com CCl<sub>4</sub>) para confirmar os resultados da morfometria.

A infecção com o verme é um fator importante para justificar o recrutamento e aumento dessas células para o fígado desses animais. Estudos da resposta imune em cabras e ratos infectados com outro verme, o trematoda *Fasciola hepatica*, mostram que o número de células CD4<sup>+</sup> aumentou significativamente no fígado e que células CD8<sup>+</sup> têm uma diminuição acentuada no baço (PÉREZ et al., 1998; POITOU et al., 1992; TLIBA et al., 2002). No estudo atual, os mesmos resultados foram observados nos ratos infectados com *C. hepatica*. A coincidência dos resultados sugere que este perfil de marcação pode estar relacionado apenas à infecção, ou seja, a resposta ao verme. E, portanto, esse aumento de células CD4<sup>+</sup>, no fígado, e diminuição de células CD8<sup>+</sup>, no baço, pode não estar envolvido no desenvolvimento da fibrose septal. Porém, a presença das células nos septos e próximas a eles, ainda assim, constitui um forte indício de participação na sua patogenia. Além disso, somente os animais infectados com a *C. hepatica* desenvolvem a fibrose septal, portanto, a infecção é um fator necessário.

Ainda, os trabalhos citados acima comentam apenas sobre os linfócitos. Não foram mencionadas, nos ensaios imunohistoquímicos, a presença de células com morfologias diferenciadas. Aqui, com o uso do anticorpo CD4 que tem reação cruzada com outros tipos celulares, além dos linfócitos, como macrófagos e células

dendríticas, pudemos observar no fígado dos animais infectados, um aumento acentuado e distribuição nos septos de células CD4<sup>+</sup> com forma alongada que, em animais normais, foram raras e localizadas próximas à cápsula e espaço-porta. A morfologia destas células pode sugerir que se trate de células dendríticas CD4<sup>+</sup>. Mas, podem ser também células epitelióides, ou seja, macrófagos modificados.

Dados recentes, na literatura, sugerem que diferentes patógenos podem estimular os distintos subtipos de células dendríticas ou que a ativação de cada subtipo pode depender da fase da resposta imune (KUNITANI et al., 2002). As células dendríticas são potentes APC (células apresentadoras de antígeno) e o subtipo desta célula envolvido é determinante para dizer se uma célula T será ativada, inativada ou eliminada (DOHERTY & O'FARRELLY, 2001). Células dendríticas CD4<sup>+</sup> estimulam a proliferação de células T melhor do que as CD4<sup>-</sup> (TRINITÉ et al., 2000). Os resultados atuais podem sugerir a participação de células dendríticas CD4<sup>+</sup> na patogenia da fibrose septal. Contudo, tais células necessitariam ser caracterizadas com marcadores específicos.

Alguns estudos sugerem a participação de células CD8<sup>+</sup> na necrose hepatocelular nas hepatites crônicas em atividade (EGGINK et al., 1982, 1984; COLUCCI et al., 1983; KOHDA et al., 1990). No modelo de infecção pelo verme *C. hepatica* existe uma necrose de hepatócitos devido aos vermes que transitam pelo parênquima e morrem ocasionando as reações inflamatórias focais. Esta pode ser a razão do aumento importante de células CD8α<sup>+</sup> nos animais infectados, devido ao grande número de lesões distribuídas pelo fígado. Além disso, hepatócitos com

aspecto apoptótico são observados na periferia dos septos fibrosos. Nesse estudo, células  $CD8\alpha^+$  além de estarem localizadas nas lesões provocadas pelo verme e seus ovos, também estão presentes próximas aos septos fibrosos. Estes resultados fortalecem a hipótese da participação dessas células na necrose de hepatócitos.

NKR-P1A é uma molécula de superfície semelhante à lectina que se liga a oligossacarídeos. A expressão de NKR-P1A na célula NK é crucial para o reconhecimento da célula-alvo e para a citotoxicidade de NK, portanto é uma molécula de ativação em células NK de ratos (LUO et al., 2000). Células T NK também atuam como células regulatórias, atribuída a secreção de IL-4 (MACKAY, 2002). Durante lesão hepática experimental provocada por injeção de concanavalina A e infecção com vetores adenovirais, as células NK têm tido um papel crucial no recrutamento de células T (CRISPE, 2003). As células  $NKR-P1A^+$  podem ter um papel importante na formação dos septos, pois são encontradas nos mesmos e podem estar recrutando as células  $CD4^+$  numerosas nos animais infetados.

## 7. CONCLUSÕES

---

1 – Foram obtidos indícios de que o sistema imune celular do fígado desempenha um papel na patogenia da fibrose septal que aparece associada com a capilaríase do rato.

2 – O indício principal se relaciona com a predominante presença de células CD4<sup>+</sup> nos ratos com fibrose septal da capilaríase, em comparação com os controles intactos, e com os ratos com fibrose induzida pelo tetracloreto de carbono.

3 - As células CD4<sup>+</sup> com a morfologia alongada e as células NKR-P1A<sup>+</sup>, que chamaram a atenção pela quantidade e peculiar distribuição nos septos fibrosos dos animais infectados, podem ter uma participação direta na patogenia da fibrose septal hepática observada aos 30 dias da infecção por *C. hepatica*.

4 - Os resultados obtidos com a marcação de CD4, CD8 $\alpha$  e NKR-P1A foram exploratórios e iniciais. Estudos adicionais devem ser realizados. O modelo experimental de injeções repetidas com soro de porco também deve ser avaliado para verificação das alterações aqui observadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ANDRADE, Z.A. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Int. J. Exp. Pathol.**, **72**: 553-562, 1991.

ANDRADE, Z.A.; GODOY, A. Influence of the route of administration of pig-serum in the induction of hepatic septal fibrosis in rats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**: 769, 1996.

ANDRADE, R.G.; GOTARDO, B.M.; ASSIS, B.C.; MENGEL, J.; ANDRADE, Z.A. Immunological tolerance to pig-serum partially inhibits the formation of septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepatica*-infected rats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**: 703-707, 2004.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, **115**: 209-218, 2005.

BERNARD, P.H.; LE BAIL, B.; CRANSAC, M.; BARCINA, M.G.; CARLES, J.; BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P. Progression from idiopathic portal hypertension to incomplete septal cirrhosis with liver failure requiring liver transplantation. **J. Hepatol.**, **22**: 495-499, 1995.

BHUNCHET, E.; EISHI, Y.; WAKE, K. Contribution of immune response to the hepatic fibrosis induced by porcine serum. **Hepatology**, **23**: 811-817, 1996.

BHUNCHET, E.; WAKE, K. The portal lobule in rat liver fibrosis: a re-evaluation of the liver unit. *Hepatology*, 27: 481-287, 1998.

BRENNER, D.A.; WATERBOER, T.; CHOI, S.K.; LINDQUIST, J.N.; STEFANOVIC, B.; BURCHARDT, E.; YAMAUCHI, M.; GILLAN, A.; RIPPE, R.A. New aspects of hepatic fibrosis. *J. Hepatol.*, 32: 32-38, 2000.

CAMERON, G.R.; KARUNARATNE, W.A.E. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Path. Bact.*, 42: 1-21, 1963.

CASSIMAN, D.; LIBBRECHT, L.; DESMET, V.; DENEFF, C.; ROSKAMS, T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J. Hepatol.*, 36: 200-209, 2002.

CRISPE, I.N. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 51-62, 2003.

COLUCCI, G.; COLOMBO, M.; DEL NINNO, E.; PARONETTO, F. In situ characterization by monoclonal antibodies of the mononuclear cell infiltrate in chronic active hepatitis. *Gastroenterology*, 85: 1138-1145, 1983.



DI VINICIUS, I.; BAPTISTA, A.P.; BARBOSA, A.A.; ANDRADE, Z.A. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. *Pathol. Res. Pract.*, **201**: 449-456, 2005.

DOHERTY, D.G.; O'FARRELLY, C. Dendritic cells: regulators of hepatic immunity or tolerance? *J. Hepatol.*, **34**: 156-160, 2001.

DOOLITTLE, M.; BOHMAN, R.; DURSTENFELD, A.; CASCARANO, J. Identification and characterization of liver nonparenchymal cells by flow cytometry. *Hepatology*, **7**: 696-703, 1987.

EGGINK, H.F.; HOUTHOFF, H.J.; HUITEMA, S.; GIPS, C.H.; POPPEMA, S. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. I. Lymphocyte subsets in liver biopsies of patients with untreated idiopathic autoimmune hepatitis, chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **50**: 17-24, 1982.

EGGINK, H.F.; HOUTHOFF, H.J.; HUITEMA, S.; WOLTERS, G.; POPPEMA, S.; GIPS, C.H. Cellular and humoral immune reactions in chronic active liver disease. II. Lymphocyte subsets and viral antigens in liver biopsies of patients with acute and chronic hepatitis B. *Clin. Exp. Immunol.*, **56**: 121-128, 1984.

EVERETT, M.L.; COLLINS, B.H.; PARKER, W. Kupffer cells: another player in liver tolerance induction. *Liver Transpl.*, **9**: 498-499, 2003.

FERREIRA, L.A.; ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 88: 441-447, 1993.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J. Hepatol.*, 38: 38-53, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, 275: 2247-2250, 2000.

GERBER, M.A.; VERNACE, S. Chronic septal hepatitis. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histol.*, 363: 303-309, 1974.

GOTARDO, B.M.; ANDRADE, R.G.; OLIVEIRA, L.F.; ANDRADE, Z.A. Production of septal fibrosis of the liver by means of foreign protein injections into rats. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36: 577-580, 2003.

JOHNSON, S.J. Extracellular matrix proteins and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology*, 43: 44-55, 1996.

KAWSER, C.A.; IREDALE, J.P.; WINWOOD, P.J.; ARTHUR, M.J. Rat hepatic stellate cell expression of alpha2-macroglobulin is a feature of cellular activation: implications for matrix remodelling in hepatic fibrosis. *Clin. Sci. (Lond)*, 95: 179-186, 1998.

KLUGEWITZ, K.; BLUMENTHAL-BARBY, F.; EULENBURG, K.; EMOTO, M.; HAMANN, A. The spectrum of lymphoid subsets preferentially recruited into the liver reflects that of resident populations. **Immunol. Lett.**, **93**: 159-162, 2004.

KNOLLE, P.A.; GERKEN, G. Local control of the immune response in the liver. **Immunol. Rev.**, **174**: 21-34, 2000.

KOHDA, H.; SEKIYA, C.; KANAI, M.; YOSHIDA, Y.; UEDE, T.; KIKUCHI, K.; NAMIKI, M. Flow cytometric and functional analysis of mononuclear cells infiltrating the liver in experimental autoimmune hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**, **82**: 473-478, 1990.

KUNITANI, H.; SHIMIZU, Y.; MURATA, H.; HIGUCHI, K.; WATANABE, A. Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases. **J. Hepatol.**, **36**: 734-741, 2002.

LALOR, P.F.; SHIELDS, P.; GRANT, A.; ADAMS, D.H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunol. Cell Biol.**, **80**: 52-64, 2002.

LEMOS, I.; BAPTISTA, A.; ANDRADE, Z. Histopatologia da cirrose hepática em regressão. In: Anais da Reunião Anual de Iniciação Científica CPqGM: 31, 2002.

LEMOS, Q.T.; MAGALHAES-SANTOS, I.F.; ANDRADE, Z.A. Immunological basis of septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepatica*-infected rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **36**: 1201-1207, 2003.

LUO, D.; VANDERKERKEN, K.; CHEN, M.C.; VERMIJLEN, D.; ASOSINGH, K.; WILLEMS, E.; TRIANTIS, V.; EIZIRIK, D.L.; KUPPEN, P.J.; WISSE, E. Rat hepatic natural killer cells (pit cells) express mRNA and protein similar to in vitro interleukin-2 activated spleen natural killer cells. **Cell Immunol.**, **210**: 41-48, 2001.

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

LUO, D.; VERMIJLEN, D.; VANDERKERKEN, K.; KUPPEN, P.J.; SEYNAEVE, C.; EDDOUKS, M.; BAEKELAND, M.; WISSE, E. Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytolysis and apoptosis of colon carcinoma cells. **J. Hepatol.**, **31**: 110-116, 1999.

MACKAY, I.R. Hepatoimmunology: a perspective. **Immunol. Cell Biol.**, **80**: 36-44, 2002.

MAHER, J.J. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. **Semin. Liver Dis.**, **21**: 417-426, 2001.

MATSUI, S.; TERABE, M.; MABUCHI, A.; TAKAHASHI, M.; SAIZAWA, M.; TANAKA, S.; YOKOMURO, K. A unique response to staphylococcal enterotoxin B by

intrahepatic lymphocytes and its relevance to the induction of tolerance in the liver.

**Scand. J. Immunol.**, **46**: 230-234, 1997.

MONTEIRO, A.N.; BOROJEVIC, R. In vitro formation of fibrous septa by liver connective tissue cells. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, **23**: 10-14, 1987.

MOSNIER, J.F.; PHAM, B.N.; WALKER, F.; DUBOIS, S.; DEGOS, F.; ERLINGER, S.; DEGOTT, C. Relationship between composition of lymphoid cell infiltrates in the liver and replication status in chronic hepatitis B: an immunohistochemical study. **Am. J. Clin. Pathol.**, **106**: 625-633, 1996.

NAKANO, M. Early morphological changes of porcine serum-induced hepatic fibrosis. **Acta Pathol. Jpn.**, **36**: 415-422, 1986.

NEVENS, F.; STAESSEN, D.; SCIOT, R.; VAN DAMME, B.; DESMET, V.; FEVERY, J.; De GROOTE, J.; VAN STEENBERGEN, W. Clinical aspects of incomplete septal cirrhosis in comparison with macronodular cirrhosis. **Gastroenterology**, **106**: 459-463, 1994.

OLIVEIRA, L.; DE SOUZA, M.M.; ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica*-induced hepatic fibrosis in rats: paradoxical effect of repeated infections. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **37**: 123-127, 2004.

OLIVEIRA, R.F.; ANDRADE, Z.A. Worm load and septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepatica*-infected rats. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **96**: 1001-1003, 2001.

PARONETTO, F.; POPPER, H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. **Am. J. Pathol.**, **49**: 1087-1101, 1966.

PEREZ, J.; DE LAS MULAS, J.M.; DE LARA, F.C.; GUTIERREZ-PALOMINO, P.N.; BECERRA-MARTEL, C.; MARTINEZ-MORENO, A. Immunohistochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **64**: 337-348, 1998.

PINZANI, M. Liver fibrosis. **Springer Semin. Immunopathol.**, **21**: 475-490, 1999.

POPPER, H.; UDENFRIEND, S. Hepatic fibrosis. Correlation of biochemical and morphologic investigations. **The Am. J. Med.**, **49**: 707-717, 1970.

POITOU, I.; BAEZA, E.; BOULARD, C. Humoral and cellular immune responses in rats during a primary infestation with *Fasciola hepatica*. **Vet. Parasitol.**, **45**: 59-71, 1992.

ROCKEY, D.C.; CHUNG, J.J. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. **J. Clin. Invest.**, **98**: 1381-1388, 1996.

ROSA, H.; PARISE, E.R.; PARANHOS, F.R.; BRAGA, A.L.; FREITAS, A.S.; HIDALGO, A.N.; MOR, M.B. Controlled production of cirrhosis in the rat liver. **Arq. Gastroenterol.**, **28**: 39-43, 1991.

SANTOS, A.B.; TOLENTINO, M.Jr.; ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of hepatic septal fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**: 503-506, 2001.

SCHINONI, M.I.; ANDRADE, Z.; DE FREITAS, L.A.; OLIVEIRA, R.; PARANÁ, R. Incomplete septal cirrhosis: an enigmatic disease. **Liver Int.**, **24**: 452-456, 2004.

SCIOT, R.; STAESSEN, D.; VAN DAMME, B.; VAN STEENBERGEN, W.; FEVERY, J.; DE GROOTE, J.; DESMET, V.J. Incomplete septal cirrhosis: histopathological aspects. **Histopathology**, **13**: 593-603, 1988.

SEKI, S.; HABU, Y.; KAWAMURA, T.; TAKEDA, K.; DOBASHI, H.; OHKAWA, T.; HIRAIDE, H. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. **Immunol. Rev.**, **174**: 35-46, 2000.

SHIBAYAMA, Y.; NAKATA, K. Significance of septal fibrosis for disturbance of hepatic circulation. **Liver**, **12**: 22-25, 1992a.

SHIBAYAMA, Y.; NAKATA, K. Role of septal fibrosis in development of hepatic circulatory disturbance in the presence of liver cell enlargement. **Liver**, **12**: 84-89, 1992b.

SHIGA, A.; SHIROTA, K.; NISHITA, T.; NOMURA, Y. Study on the pathogenesis of porcine serum-induced liver fibrosis in rats with special reference to the effects of hypertension. **J. Vet. Med. Sci.**, **60**: 29-34, 1998.

SHIGA, A.; SHIROTA, K.; IKEDA, T.; NOMURA, Y. Morphological and immunohistochemical studies on porcine serum-induced rat liver fibrosis. **J. Vet. Med. Sci.**, **59**: 159-167, 1997.

SOUZA, M.M. *Estudos sobre a fibrose septal hepatica induzida por Capillaria hepatica. (patogênese e evolução)*. 2003. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

SUGIHARA, A.; TSUJIMURA, T.; FUJITA, Y.; NAKATA, Y.; TERADA, N. Evaluation of role of mast cells in the development of liver fibrosis using mast cell-deficient rats and mice. **J. Hepatol.**, **30**: 859-867, 1999.

TAN, J.; HYTIROGLOU, P.; WIECZOREK, R.; PARK, Y.N.; THUNG, S.N.; ARIAS, B.; THEISE, N.D. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. **Liver**, **22**: 365-373, 2002.



TLIBA, O.; CHAUVIN, A.; LE VERN, Y.; BOULARD, C.; SBILLE, P. Evaluation of the hepatic NK cell response during the early phase of *Fasciola hepatica* infection in rats.

**Vet. Res.**, **33**: 327-332, 2002.

TRINITE, B.; VOISINE, C.; YAGITA, H.; JOSIEN, R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. **J. Immunol.**, **165**: 4202-4208, 2000.

TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Semin. Liver Dis.**, **10**: 56-65, 1990.

WANLESS, I.R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **124**: 1599-1607, 2000.

WRIGHT, K.A. Observations on the life cycle of *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893) with a description of the adult. **Can. J. Zool.**, **38**: 167-182, 1961.

ZEN, Y.; SUNAGOZAKA, H.; TSUNEYAMA, K.; MASUTOMI, K.; TERASAKI, S.; KANEKO, S.; KOBAYASHI, K.; NAKANUMA, Y. Incomplete septal cirrhosis associated with Wegener's granulomatosis. **Liver**, **22**: 388-393, 2002.

## ANEXO 1

---

### GRADUAÇÃO DE FIBROSE

Para avaliar os diferentes graus de fibrose foi utilizada uma escala de avaliação semiquantitativa. Essa escala foi baseada em uma análise semiquantitativa utilizada em seres humanos, já bem estabelecida, denominada METAVIR. O sistema METAVIR consiste em avaliar dois aspectos anátomo-patológicos da doença hepática crônica: a atividade e a fibrose. Inicialmente foi utilizado apenas nas doenças virais e, atualmente, presta-se para graduação em doenças hepáticas crônicas de qualquer etiologia. Nesse estudo, utilizamos a avaliação, de modo crescente, dos graus de fibrose distribuída pelo parênquima hepático conforme descrito abaixo:

- F0. Não há fibrose
- F1. Fibrose portal sem septos
- F2. Fibrose portal e qualquer septo
- F3. Fibrose septal sem cirrose
- F4. Cirrose

Referência: Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996;24:289-293.