

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA - CAMPUS DE BOTUCATU

**FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA: CARACTERIZAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES ENVOLVIDOS**

ANDREIA REGINA LORDELO WLUDARSKI

ORIENTADORA: KUNIE IABUKI RABELO COELHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista – UNESP para obtenção do título de
Doutor em Patologia

BOTUCATU – SP

2008

ÍNDICE

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA	02
MECANISMOS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA	07
CÉLULAS SINUSOIDAIS	08
HEPATÓCITOS	10
CÉLULAS OVAIS	13
CÉLULAS PROGENITORAS MULTIPOTENTES DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
OBJETIVOS	34
MANUSCRITO	35
RESUMO	35
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	74
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

Revisão bibliográfica

FALÊNCIA HEPÁTICA AGUDA

Falência hepática fulminante, sinônimo de falência hepática aguda é uma alteração rara que representa uma das emergências mais desafiadoras encontradas na prática clínica (SASS & SHAKIL, 2005).

A falência hepática aguda (FHA) foi definida pela primeira vez em 1970 por Trey e Davidson, como sendo uma síndrome caracterizada por hepatite aguda grave complicada pelo rápido desenvolvimento de encefalopatia hepática (EH) na ausência de doença hepática pré-existente (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000; GILL & STERLING, 2001).

Poucas condições na medicina são mais dramáticas ou mais devastadoras do que a falência hepática fulminante. Há perda abrupta das funções metabólicas e da capacidade de síntese de diversas substâncias pelo fígado, progredindo rapidamente para a disfunção de múltiplos órgãos e a morte do indivíduo pode ocorrer mesmo quando o fígado começa a se recuperar (BERK et al, 1991; BERNAL & WENDON, 2000).

Nível crítico de morte celular não compensada por atividade regenerativa hepatocelular é fundamental para o desenvolvimento da FHA. A morte da célula hepática pode ocorrer através de dois mecanismos distintos que são a apoptose e a necrose (SHERLOCK, 1989; RIORDAN et al, 2003; RUTHERFORD & CHUNG, 2008).

A apoptose é manifestada pela transformação do citoplasma da célula em estruturas globosas com preservação da membrana celular e ausência da liberação de enzimas proteolíticas (RIORDAN et al, 2003). A maioria, se não a totalidade das células que sofrem apoptose, passam por ativação de membros das proteases da família das caspases, as quais agem como transdutores e efetores da morte celular (GUO & HAY, 1999).

A necrose ocorre quando há quebra no estado de equilíbrio fisiológico da célula, resultante da ação degradativa de enzimas, que envolve a lise do citoplasma e

do núcleo levando ao extravasamento do conteúdo celular com conseqüente inflamação (QUARESMA, 2003; RIORDAN et al, 2003). Desse modo as alterações histológicas encontradas na FHA podem diferir de acordo com o mecanismo de morte celular envolvido (RIORDAN et al, 2003).

O tempo decorrente entre a instalação da manifestação clínica do dano hepático agudo e a manifestação da encefalopatia hepática determina a classificação da falência hepática em fulminante ou sub-fulminante (LEE, 1993; OSTAPOWICZ & LEE, 2000). Pacientes que manifestam encefalopatia hepática dentro de 2 a 8 semanas pós surgimento de icterícia integram o grupo da falência hepática fulminante, enquanto que, quando essa manifestação ocorre de 8 a 12 semanas classifica-se como falência hepática sub-fulminante (O'GRADY et al, 1993; WILLIAMS, 1996; GILL, 2001; MACSWEEN et al, 2002).

Outra classificação, também, com base no intervalo entre a manifestação da icterícia e a encefalopatia hepática, propõe o termo falência hepática hiperaguda quando esse intervalo é menor do que 7 dias; quando o intervalo está entre 7 e 28 dias, falência hepática aguda e falência hepática subaguda quando esse intervalo está compreendido entre 28 dias e 3 meses (MACSWEEN et al, 2002).

Agressões hepáticas de diferentes causas podem levar a FHA. As etiologias variam nas diferentes partes do mundo, porém, a maioria dos casos está relacionada à etiologia viral ou a fármacos e toxinas (LEE, 2008; LEE & SEREMBA, 2008). Uma significativa porcentagem dos casos de FHA, em torno de 17%, permanece sem etiologia definida apesar do grande interesse dos pesquisadores na sua investigação e nesse grupo provavelmente estão incluídos drogas com toxicidade desconhecida e possivelmente doenças genéticas ou metabólicas também desconhecidas e outros vírus (KLATSKIN & CONN, 1993; WILLIAMS & RIORDAN, 2000; GILL & STERLING, 2001; LEE, 2003; SASS & SHAKIL, 2005).

Outras causas de FHA incluem neoplasias (BHATI et al, 2008); alterações metabólicas e/ou genéticas conhecidas, como a intolerância hereditária à frutose, Doença de Wilson, deficiência de Alfa1 antitripsina; esteatose aguda da gravidez;

alterações vasculares como a Síndrome de Budd-Chiari e doença veno-oclusiva e outras como as hepatites auto-imunes (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

Nos pacientes pediátricos podem-se citar hepatites neonatais de diferentes etiologias (TREEM, 2002; SQUIRES, 2008), hepatite auto-imune, vírus como os da família do herpes vírus, adenovírus, parvovírus e vírus da hepatite B, intoxicação por fármacos e doenças metabólicas inerentes à infância como tirosinemia hereditária, galactosemia, hemocromatose neonatal e erros do metabolismo de ácidos biliares entre outros, como possíveis etiologias, sendo que muitos dos casos apresentam etiologia não definida (BHADURI & MIELI-VERGANI, 1996; DURAND, 2001; TREEM, 2002; LEE, 2003; DHAWAN & MIELI-VERGANI, 2005).

Os vírus das hepatites A (BERNAL & WENDON, 2000; SCHIODT et al, 2003), B (BERNAL & WENDON, 2000; SCHIODT et al, 2003; MUDAWI & YOUSIF, 2007; HIRAMATSU et al, 2008; ESCORSELL et al, 2008) e E têm sido implicados como causas de hepatite fulminante (BERNAL & WENDON, 2000; SCHIODT et al, 2003; PÉRON et al, 2007). O papel da infecção aguda pelo vírus C (VHC) na FHA é controverso, sendo sua prevalência muito baixa (VENTO et al, 1998).

Estudo prospectivo realizado com 595 pacientes com FHA demonstrou que a infecção aguda pelo vírus A em portadores crônicos de hepatite pelo vírus C, aumenta o risco de evolução para FHA (VENTO et al, 1998).

Em outro estudo realizado na América Latina, o vírus da hepatite A foi implicado como sendo o principal agente etiológico na população estudada (CIOCCA et al, 2007).

Outros vírus envolvidos na FHA são o citomegalovírus, o herpes simples (MONTALBANO et al, 2005) e vírus relacionados com febres hemorrágicas (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

Os fármacos e toxinas podem levar a FHA por meio de dois mecanismos: a hepatotoxicidade direta do fármaco e a indiosincrasia (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

A toxicidade dos fármacos no fígado ocorre por ação direta, por meio de metabólitos tóxicos que alteram as proteínas locais ou por meio de radicais livres que causam peroxidação lipídica e oxidação protéica (LOSSER & PAYEN, 1996).

As reações idiosincrásicas ocorrem em indivíduos susceptíveis, pela formação de neoantígenos, que funcionam como alvos, propiciando o ataque imunológico por parte do organismo ou pela direta interrupção da função celular normal (OSTAPOWICZ & LEE, 2000). Nessa categoria podemos citar o papel do ácido acetil salicílico na Síndrome de Reye, substâncias contidas em algumas plantas medicinais, halotano e isoniazida entre outros (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

O paracetamol promove efeito tóxico direto aos hepatócitos, representando causa importante de FHA em alguns países como os EUA, Reino Unido (PONIACHIK et al, 2002; LEE, 2004; LARSON et al, 2005; FONTANA, 2008; LEE & SEREMBA, 2008), Austrália (GOW et al, 2004) e Suécia (WEI et al, 2007). Em países como o Japão, Índia (LEE, 2003), Espanha (ESCORSELL et al, 2008) e África (MUDAWI & YOUSIF, 2007) o mesmo não tem sido observado.

Muitos outros fármacos incluindo halotano (WILLIAMS, 1996), isoflurano (MARTIN et al, 2001), inibidores da monoamino-oxidase, antiinflamatórios não esteróides (WILLIAMS, 1996; ANDRADE et al, 2000; SCHATNER et al, 2000), valproato de sódio, sulfonamidas, fenitoína, cetoconazol (WILLIAMS, 1996) e disulfiram (MOHANTY et al, 2004) entre outros, têm sido implicados como agentes que levam a FHA. A droga Ecstasy é reconhecida como causadora de efeito hepatotóxico direto que pode levar a falência hepática aguda (BERNAL & WENDON, 2000).

Fitoterápicos também têm sido reconhecidos como potencialmente hepatotóxicos. Como exemplo pode ser citado um relato de caso do uso da erva

chinesa “Ma huang”, que contém alcalóides do tipo efedrina, causando FHA com necessidade de transplante hepático (SKOULIDIS et al, 2005).

Os sinais clínicos finais da FHA independem da etiologia e incluem alterações das enzimas hepáticas, icterícia, coagulopatia, encefalopatia, hipotensão e insuficiência renal aguda, além de maior suscetibilidade a infecções evoluindo para falência de múltiplos órgãos (LEE, 1993; GILL & STERLING, 2001; PONIACHIK, 2002; LEE, 2003; BLEI, 2005; JALAN, 2005).

Macroscopicamente, o fígado pode estar reduzido em tamanho, com comprometimento difuso e mais ou menos uniforme, apresentando superfície de corte amarelada ou avermelhada, podendo ser visualizadas áreas com parênquima totalmente colapsado alternando-se com nódulos grandes de parênquima preservado ou em regeneração (O’GRADY et al, 1993; BURKITT et al, 1994; KHASHAB et al, 2007).

Microscopicamente caracteriza-se por extensa necrose dos hepatócitos, mas pode apresentar manifestações clínicas de falência hepática aguda sem necrose como ocorre na síndrome de Reye e na esteatose aguda da gravidez (LEE, 1993). O quadro histopatológico típico é representado por necrose hepatocelular de coagulação panlobular, em geral, com preservação da arquitetura hepática. Outras alterações incluem colapso lobular, ilhas de hepatócitos remanescentes ou regenerativos, infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e poucos linfócitos, e proliferação de estruturas semelhantes a ductulos, próximo aos espaços porta (CRAWFORD, 2000; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; GARTNER & HIATT, 2001; GILL & STERLING, 2001).

Nos casos de FHA causada pela síndrome de Reye, esteatose aguda da gravidez, ou toxicidade pelo valproato de sódio e pela tetraciclina, o fígado apresenta esteatose microvesicular, sem necrose confluyente (GILL & STERLING, 2001).

O prognóstico da FHA é reservado, sendo o transplante hepático a forma emergencial de tratamento com maior impacto na sobrevivência dos pacientes (BERNAL & WENDON, 2004; BACCARANI et al, 2005). Estimam-se que 80%

dos pacientes vão a óbito quando não realizado o transplante (GOW et al, 2004; SASS & SHAKIL, 2005).

O transplante hepático, entretanto, beneficia número limitado de pacientes devido à quantidade deficitária de órgãos disponíveis, além de ser um procedimento de alto custo, com considerável taxa de mortalidade e na maioria dos casos requerendo terapia imunossupressiva de longa duração que pode trazer complicações (KAY & FAUSTO, 1997; SHAFRITZ et al, 2001).

Desse modo, outras alternativas que possam substituir o transplante hepático têm sido investigadas, entre elas sistemas de detoxificação/purificação sanguínea (ROZGA, 2006), terapia celular (ROZGA, 2006), suporte hepático extra corpóreo (SEN & WILLIAMS, 2003) e imortalização de células hepáticas fetais (WEBER, 2003).

Nas últimas décadas muitos esforços foram empregados para o isolamento de hepatócitos e sua posterior utilização para transplante e tratamento de diversas doenças hepáticas, sem muito sucesso. Recentemente, entretanto, diversos modelos animais têm demonstrado que os hepatócitos podem ser substituídos por células transplantadas, num fenômeno análogo ao que ocorre quando da repopulação das células hematopoiéticas após o transplante de medula óssea (SHAFRITZ et al, 2001; LACONI & LACONI, 2002; BACCARANI et al, 2005).

MECANISMOS DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA

O fígado adulto normal é um tecido estável com “turnover” celular baixo quando comparado com outros órgãos e tecidos como a mucosa intestinal e a medula óssea, que são lábeis e apresentam renovação celular contínua. Entretanto, hepatócitos adultos diferenciados têm capacidade de se proliferar quando há perda de massa hepática (STRAIN, 1997).

O fígado mantém um perfeito balanço entre ganho e perda celular, e a resposta restitutiva do fígado a diferentes injúrias envolve proliferação de diferentes células do tecido hepático (hepatócitos, células de Kupffer, células de Ito e células

ductais). A regeneração hepática é um processo de múltiplos passos, que envolve a atuação de numerosas citocinas, fatores de crescimento, fatores metabólicos e ativação de genes (FAUSTO, 2005; JAKUBOWSKI et al, 2005; FAUSTO et al, 2006).

Os tipos celulares envolvidos diretamente no processo de regeneração hepática são as células com capacidade proliferativa e as células que atuam produzindo substâncias capazes de promover a proliferação, como as células de Kupffer e as células hepáticas estreladas.

Existem três tipos de células com capacidade proliferativa para reposição hepatocelular: 1) hepatócitos maduros, 2) células ovais hepáticas e 3) células progenitoras multipotentes derivadas da medula óssea (FAUSTO, 2001; SELL, 2001; ZHENG & TANIGUCHI, 2003).

Células sinusoidais

As células de Kupffer (CK) foram descritas pela primeira vez em 1876 através de um método histoquímico com cloreto de ouro. Representam cerca de 31% das células sinusoidais (MALIK et al, 2002). Elas permanecem no lúmen dos sinusóides, sob ou entre as células endoteliais, apresentam núcleo reniforme e citoplasma abundante com prolongamentos na forma de processos irregulares ou de estrela que mantêm contato direto com as células hepáticas estreladas e hepatócitos, são encontradas em todo o fígado, sendo mais numerosas perto dos espaços-porta (WINWOOD & ARTHUR, 1993; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000).

As CK são macrófagos residentes do fígado, que possuem capacidade de fagocitose, apresentação de antígenos e secreção de substâncias ativas como fatores de crescimento e metaloproteinases (SHIRATORI et al, 1993). Elas são originadas em parte pelo recrutamento de monócitos circulantes e em parte da proliferação de populações endógenas de macrófagos.

O anticorpo CD68 para imunomarcação das CK é particularmente útil para estudos quantitativos uma vez que esse anticorpo pode ser utilizado em tecidos fixados em blocos de parafina (BURT et al, 1993).

As CK modulam a resposta imune e inflamatória por meio da secreção de citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral, e eicosanóides, além de estimularem a produção de enzimas lisossomais e proteolíticas. Outra função importante das CK é a neutralização dos radicais livres (WINWOOD & ARTHUR, 1993; MALIK et al, 2002).

Nos casos de FHA, essas células são importantes para retirada de microorganismos e endotoxinas do sangue portal, o que explica o fenômeno de aumento de incidência de septicemia por Gram negativos e choque séptico quando ocorre diminuição dessa função (WINWOOD & ARTHUR, 1993).

As células hepáticas estreladas (CHE), também conhecidas como lipócitos, células armazenadoras de gordura, células peri-sinusoidais ou de Ito, são precursoras inativas de fibroblastos, estando envolvidas na fibrogênese (BENYON & ARTHUR, 2001) e no controle do fluxo sanguíneo sinusoidal (BLOMHOFF & WAKE, 1991; YAMANE et al, 1993; AHERN et al, 1996; SAKAIDA et al, 1998; SENOO, 2004).

As CHE contém núcleos comprimidos e chanfrados por vesículas lipídicas no citoplasma e apresentam nucléolos ocasionais representando entre 5% e 8% das células do fígado normal. Elas estocam vitamina A e outros lipídeos, morfologicamente são parecidas com as células de Kupffer em forma e tamanho, porém, são menos numerosas e sua identificação é bastante difícil nas seções de rotina do fígado normal, sendo visualizadas quando coradas com azul de toluidina (BURT et al, 1993; KLATSKIN & CONN, 1993).

Essas células estão em íntimo contato com terminações nervosas e são positivas para alfa-actina de músculo liso em crianças e adolescentes, tornando-se negativas em adultos até que ocorra sua ativação sob condições patológicas. Quando ativadas podem ser distinguidas das células endoteliais por sua coloração positiva para muramidase e por PAS depois de digestão com diastase (SCHEUER &

LEFKOWITCH, 2000). Em ambas as condições, quiescentes ou ativadas, elas são positivas para sinaptofisina (MACSWEEN & SCOTHORNE, 1994).

No fígado em regeneração, as CHE atuam tanto na fase inicial por meio da elaboração e secreção de substâncias que estimulam a proliferação, quanto na fase mais tardia, inibindo a proliferação e atuando na remodelação da matriz extracelular. Produzem fatores de crescimento e citocinas, entre eles, o fator de crescimento do hepatócito, o fator do crescimento fibroblástico, o fator transformador do crescimento alfa e o fator de necrose tumoral. Todos esses fatores apresentam receptores correspondentes expressos nas células ovais (DABEVA & SHAFRITZ, 2003).

Hepatócitos

Os hepatócitos maduros são células poligonais com bordas bem definidas com um ou mais núcleos e nucléolos geralmente visíveis, que correspondem a 90% da massa hepática e a 65% do número total de células no fígado. Eles formam paredes interconectadas ou placas separadas entre si por um labirinto sinusoidal recoberto por células endoteliais. Entre as células endoteliais e os hepatócitos, há o espaço de Disse contendo componentes da matriz extracelular, nervos e CHE (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; GARTNER & HIATT, 2001).

No fígado normal que não sofreu danos, quase todos os hepatócitos permanecem em estado quiescente, ou seja, na fase G0 do ciclo celular e muito poucos deles podem realizar mitose (PAWLOWSKI & JURA, 2006).

A capacidade do fígado adulto em se regenerar é reconhecida desde a antiga mitologia grega. Prometheus, que habitava a terra antes da criação dos seres humanos, ofendeu a Zeus e como punição foi amarrado a uma rocha no Monte Cáucaso, onde todas as noites, uma águia devorava mais da metade de seu fígado, que voltava a se regenerar (THEISE & KRAUSE, 2002; KONIARIS, 2003; SELL, 2003; TAUB, 2004; TARLA et al, 2006 ⁽¹⁰⁴⁾; KHAN & MUDAN, 2007).

Essa capacidade regenerativa foi demonstrada por HIGGINS E ANDERSON em 1931, com modelos de hepatectomia parcial em roedores, que consistia na retirada de 2/3 do fígado com remoção dos dois lobos frontais. Ocorria um processo de hiperplasia compensatória, no qual os segmentos remanescentes aumentavam em tamanho por proliferação celular. Os hepatócitos, que permaneciam quiescentes, apresentavam uma surpreendentemente alta capacidade regenerativa, de modo que, em fígados de ratos submetidos à hepatectomia parcial, 90 a 95% dos hepatócitos remanescentes replicavam dentro das primeiras 40 horas pós-operatórias (KAY & FAUSTO, 1997; SELL, 2003; FAUSTO, 2004; TAUB, 2004; PAHLAVAN et al, 2006; TARLA et al, 2006 ⁽¹⁰⁴⁾; KHAN & MUDAN, 2007).

A perda do parênquima hepático, induzida por agressão aguda, cirúrgica ou química, desencadeia um processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada. A restauração ocorre de forma regulada e precisa, sendo que os hepatócitos constituem a linha de frente na resposta a injúria ou ressecção parcial (KAY & FAUSTO, 1997; FAUSTO, 2001; FAUSTO, 2004).

Os hepatócitos quiescentes iniciam uma série de passos bem orquestrados que incluem estádios distintos e reconhecidos como fase de iniciação ou capacitação, fase de progressão, fase de proliferação ou replicação, e fase de inibição conforme ilustrado na figura 1 (COURT et al, 2002; KONIARIS, 2003; MANGNALL, BIRD, MAJEED, 2003; KHAN & MUDAN, 2007).

Apesar de diversos trabalhos sobre o assunto, ainda se mantém sem resposta quais são os fatores, mudanças e/ou fenômenos que iniciam o processo de regeneração hepática (COURT et al, 2002; KONIARIS, 2003; TARLA et al ⁽¹⁰³⁾, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas quando ocorre dano hepático podem estar envolvidas no processo de regeneração, uma vez que são citotóxicos importantes. Como resultado da liberação das ERO ocorre ativação do sistema complemento. Os componentes C3 e C5 do complemento estimulam as CK a produzir citocinas (PAWLOWSKI & JURA, 2006).

A fase de iniciação corresponde a uma preparação dos hepatócitos para que eles possam estar aptos a replicar e responder aos fatores de crescimento. As citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 6 (IL-6), estão envolvidas nessa fase, o que equivale a entrada dos hepatócitos quiescentes no ciclo celular (transição de G0 para G1). Essas citocinas sensibilizam os hepatócitos a responderem ao efeito mitogênico dos fatores de crescimento e nessa fase ocorre também o aumento na expressão de diversos genes associados com a produção de fatores de transcrição, resposta inflamatória e estresse, modificação da matriz extracelular e do citoesqueleto e regulação da entrada no ciclo celular (FAUSTO, 2001; PALMES et al, 2005; PAWLOWSKI & JURA, 2006; FAUSTO & RIEHLE, 2005; FAUSTO et al, 2006; RUTHERFORD & CHUNG, 2008).

A continuidade do ciclo celular é regulada pelos fatores de crescimento. Existem pelo menos três fatores de crescimento importantes no processo de regeneração, o fator de crescimento do hepatócito (HGF), o fator transformador do crescimento alfa (TGF- alfa) e o fator de crescimento epidérmico (EGF). Os efeitos mitogênicos dos fatores de crescimento atingem os hepatócitos e outros tipos celulares (OH et al, 2002; KONIARIS, 2003; ZIMMERMANN, 2004; FAUSTO & RIEHLE, 2005; PALMES et al, 2005; SANTONI-RUGIU et al, 2005; PAHLAVAN et al, 2006; TARLA et al ⁽¹⁰³⁾, 2006).

O processo de multiplicação celular permanece até o fígado atingir seu peso original, com pequena variação de 5 a 10%, chegando à última fase do processo que é a inibição do crescimento hepático. Essa fase é controlada pelo fator transformador do crescimento beta (TGF- Beta) e pela activina, que atuam como fontes inibitórias do processo de regeneração. O TGF- Beta é secretado por hepatócitos e plaquetas (ZIMMERMANN, 2004; BALABAUD et al, 2005; SANTONI-RUGIU et al, 2005; NGUYEN et al, 2007) . O tamanho hepático apropriado é alcançado de acordo com a proporção entre o fígado e a massa corporal (PAWLOWSKI & JURA, 2006; TARLA et al ⁽¹⁰³⁾, 2006).

O processo de regeneração estrutural dos hepatócitos ocorre juntamente com uma resposta remodeladora, resultando na reconstrução do lóbulo hepático vascularizado (ZIMMERMANN, 2004).

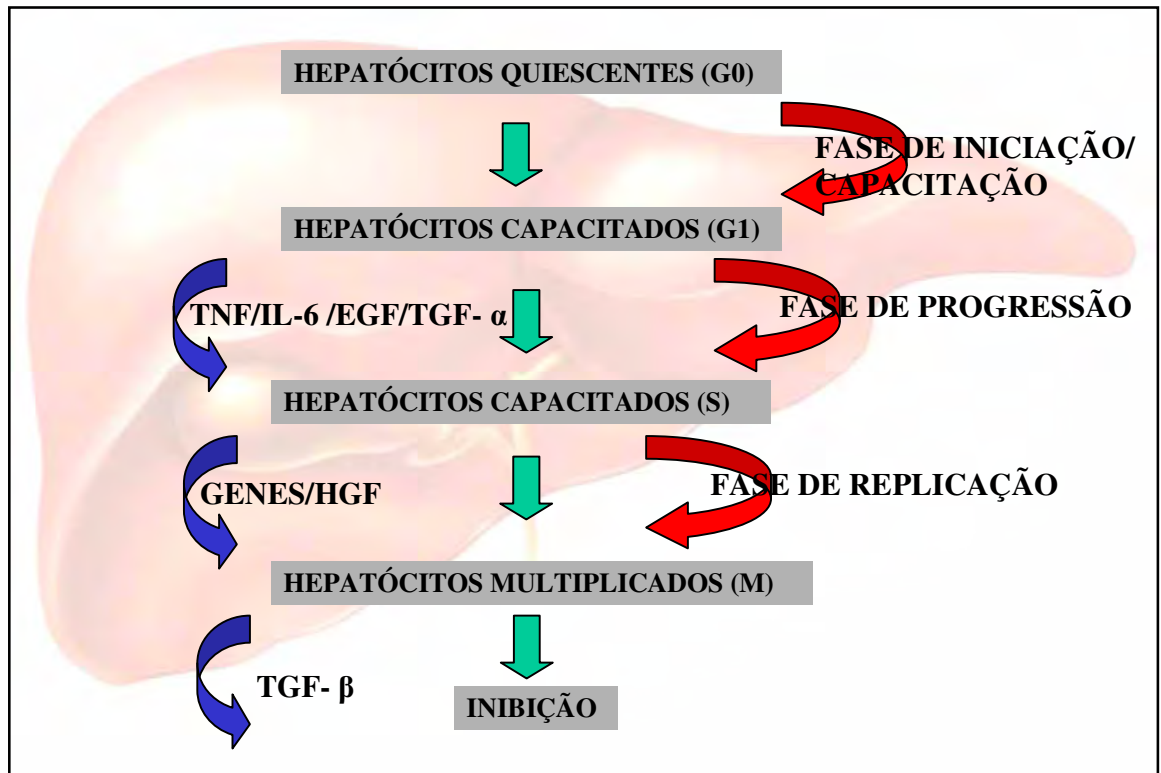


Figura 1: Fases da regeneração dos hepatócitos

Células ovais

Apesar da existência da célula progenitora hepática ter sido controversa por muitas décadas, atualmente é aceito que o fígado apresenta células com propriedades progenitoras, que podem ser ativadas sob algumas condições, para proliferação e diferenciação em células com fenótipo de células hepáticas maduras (hepatócitos e colangiócitos), definindo a propriedade mais básica das células progenitoras: o potencial de gerar novas células funcionalmente diferenciadas (ALISON, 2002; ZHENG & TANIGUCHI; 2003).

As primeiras indicações de que havia outro mecanismo de regeneração celular no fígado apareceram com as observações de Farber em 1950, em experimentos para descrever a resposta celular em fígados de animais submetidos a substâncias hepatotóxicas (LIBBRECHT & ROSKAMS, 2002; STRAIN et al, 2003).

Estudos experimentais de hepatocarcinogênese química em ratos demonstraram uma população de células epiteliais primitivas pequenas e com núcleo oval e pouco citoplasma, denominadas células ovais devido a sua forma, que eram visualizadas nas áreas peri-portais. Provavelmente essas células, apareciam após ativação e processo de crescimento expansivo, e migravam dos tratos portais para o parênquima onde se diferenciavam em hepatócitos. Eram capazes também de se diferenciar em células epiteliais dos ductos biliares ou células “anormais” inicialmente conhecidas como células ductulares proliferativas (STRAIN, 1997; ROSKAMS, et al, 2003; STRAIN et al, 2003).

A existência dessas células no fígado normal é de difícil comprovação, sendo provavelmente mais correto considerar a célula oval como progênie ativada das células progenitoras dentro do fígado (STRAIN et al, 2003).

As primeiras indicações de que as células progenitoras existiam no fígado humano veio por meio da microscopia eletrônica, e em resposta a muitas doenças colestáticas hepáticas (STRAIN et al, 2003).

Essas células são conhecidas no fígado humano como células de fenótipo intermediário entre os hepatócitos e as células ductais e chamadas de hepatócitos transicionais, hepatócitos biliares, células “hepatócito-like” ou células ovais (SELL, 2001; PARENT et al, 2004).

As células ovais hepáticas humanas são descritas como células epiteliais pequenas com núcleos ovais e citoplasmas escassos, similares às células ovais dos ratos. No fígado normal, provavelmente localizam-se na área periportal, junto aos canais de Hering, que representam o início da árvore biliar para onde convergem os canalículos biliares (KAY & FAUSTO, 1997; STRAIN, 1997; OH et al, 2002;

LIBBRECHT & ROSKAMS, 2002; FAUSTO & CAMPBELL, 2003). Elas são dificilmente reconhecíveis pelas colorações de rotina, sendo necessário o uso de marcadores imuno-histoquímicos ou da microscopia eletrônica para identificá-las (ROSKAMS et al, 2003).

Como essas células são raras em fígados normais, a origem das células ovas torna-se um tópico de debate, podendo ser oriundas tanto de fonte exógena, quanto endógena, ou de ambas (ZHENG & TANIGUCHI; 2003).

A célula oval humana ou células progenitoras no fígado humano tem sido alvo de intensa investigação. Hepatócitos fetais (hepatoblastos) têm capacidade proliferativa e capacidade bipotencial de gerar tanto hepatócitos quanto células do epitélio ductal (RUCK et al, 1997; FAUSTO & CAMPBELL, 2003), porém, a obtenção de um número suficiente dessas células é limitado (ROSKAMS et al, 2003).

As células ovas compartilham marcadores imuno-histoquímicos com hepatócitos (OV-6, alfa-feto proteína, albumina, CK8, CK18, CK7, CK19 e HepPar-1), com as células epiteliais de ductos biliares (CK8, CK18, CK19) e com células progenitoras hematopoiéticas circulantes (c-Kit, CD34, Thy-1 e Flt-3) (RUCK et al, 1997; ROSKAMS et al, 1998; ALVES et al 1999; MA et al, 2001; GOLDSTEIN & SILVERMAN, 2002; TAN et al, 2002; ROSKAMS et al, 2003; ZHENG & TANIGUCHI, 2003; PARENT et al, 2004; KATOONIZADEH et al, 2006).

Dois marcadores presentes nas células progenitoras hematopoiéticas e que agora são implicados na biologia das células progenitoras hepáticas são o c-kit e o CD34 (CROSBY et al; 2001). A presença do c-kit tornou-se aparente em fígados de ratos nas células ovas ativadas após lesão hepática ou exposição a carcinógenos. No fígado do feto humano, os hepatoblastos, células da placa ductal e epitélio biliar também são marcados pelo c-kit (STRAIN et al, 2003).

Candidatas a células progenitoras do fígado humano adulto normal e patológico foram identificadas usando-se os marcadores como o OV6, CD34 e c-kit (ALISON et al, 2001). A falta de especificidade dos marcadores, entretanto,

continua um problema, e futuramente marcadores mais específicos serão necessários (ZHENG & TANIGUCHI; 2003).

O OV6 não é um marcador específico para células ovais/ progenitoras, uma vez que a análise morfológica demonstra que o OV6 é expresso não só por células ovais como também por hepatócitos, células ductulares reativas e surpreendentemente também por células de ductos biliares intactos (STRAIN et al, 2003).

No fígado humano adulto o c-kit marca discretamente algumas células nos tratos portais e adjacências, nos ductos biliares do fígado doente e nunca um número significativo no fígado normal (STRAIN et al, 2003).

A célula oval tem sido proposta como sendo a célula ideal para ser transplantada, uma vez que essas células possuem capacidade para se multiplicar, para se diferenciar em células hepáticas maduras e células do epitélio ductal, apresentam mínima imunogenicidade, podem ser criopreservadas e reconstituem o tecido hepático quando transplantadas (SUSICK et al, 2001).

As células ovais constituem conforme citado, um segundo compartimento de reserva proliferativo que se encontra quiescente e é ativado, assumindo um papel maior no crescimento e repovoamento hepático, quando o fígado é gravemente agredido resultando em perda considerável de sua massa celular e a proliferação dos hepatócitos fica lenta ou inibida (STRAIN, 1997; ALISSON, 1998; FAUSTO, 2000; ALISON et al, 2001; FAUSTO, 2001; CROSBY et al; 2001; CROSBY et al; 2002; WRIGHT, 2002; STRAIN et al, 2003; THORGEIRSSON & GRISHAM, 2003; ZHENG & TANIGUCHI, 2003).

Exemplos de situações onde os hepatócitos ficam incapacitados são o uso de tetracloreto de carbono que leva a necrose extensa dos hepatócitos, o uso de acetilaminofluoreno que bloqueia a capacidade proliferativa dos mesmos, injúria por galactosamina, por paracetamol, entre outros no caso de fígados de camundongos (ALISON et al, 2001; LOWES et al, 2003; SANTONI-RUGIU et al, 2005). No caso de fígados humanos, a doença hepática gordurosa, a necrose hepática maciça e a

doença hepática crônica são incluídas como patologias onde se observa presença das células progenitoras (SANTONI-RUGIU et al, 2005). Experimentalmente podem ser usados modelos com ratos que apresentam mutações gênicas que alteram a proliferação dos hepatócitos, levando a ativação das células ovas (ALISON, 1998).

Quando a ativação das células ovas é necessária, a resposta se inicia próxima aos pequenos ductos biliares interlobulares e aos canais de Hering, extendendo-se para o outro lado da placa limitante e formando ramificações de ductos em meio ao parênquima antes que essas células se diferenciem em hepatócitos (ALISON et al, 2001).

As células ovas são iniciadas também por citocinas e fatores de crescimento e reguladores peptídicos secretados pelas CHE (ALISON, 1998, LOWES et al, 2003).

As células ovas são menos sensíveis a inibição de crescimento estimulada pelo TGF- β do que os hepatócitos, o que sugere uma relação no mecanismo da proliferação das células ovas num meio inibitório a proliferação dos hepatócitos (NGUYEN et al, 2007).

A regulação da proliferação das células ovas não é totalmente entendida, mas atualmente tem sido destacado um membro da família do TNF-alfa indutora de apoptose denominada TWEAK, que parece atuar seletivamente sobre células ovas estimulando a sua proliferação, não apresentando efeito sobre hepatócitos maduros (FAUSTO, 2005; JAKUBOWSKI et al, 2005).

Sendo assim, funcionalmente as CK e as CHE, são essenciais na proliferação tanto de hepatócitos, quanto de células ovas, uma vez que elas produzem quase todas as citocinas e fatores de crescimento requeridos no processo de regeneração (FAUSTO et al, 1995; FAUSTO, 2004; FAUSTO & RIEHLE, 2005).

Pesquisas com células progenitoras hepáticas são responsáveis pelo surgimento de uma nova era de muitas expectativas. A terapia celular pode ser uma alternativa para muitos pacientes, sendo a célula progenitora a célula ideal. Por isso, a identificação e caracterização das células progenitoras é essencial para a clínica de

transplante celular, terapia gênica e engenharia tecidual (DABEVA & SHAFRITZ, 2003; SCHMID, 2003).

Células progenitoras multipotentes derivadas da medula óssea

A célula progenitora exógena ao fígado, derivada das células progenitoras hematopoiética, foi proposta, mas existe controvérsia sobre o assunto (MITAKA, 2001; HODGSON, 2003; ZHENG & TANIGUCHI, 2003; JANG & SHARKIS, 2004). Trabalhos demonstram a capacidade das células tronco da medula óssea de se transdiferenciarem em hepatócitos, porém, a reposição de hepatócitos por células oriundas da medula óssea é um evento lento e raro que pode ocorrer independente de injúria hepática (MITCHELL & FAUSTO, 2002; FAUSTO, 2005; FAUSTO et al, 2006). A importância fisiológica e terapêutica dessas células permanece controversa (THEISE & KRAUSE, 2002).

Referências bibliográficas

1. ALISON, M. Liver regeneration with reference to stem cells. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 385-387.
2. ALISON, M.; POULSOM R.; FORBES, S. T. Update on hepatic stem cells. **Liver**. 2001; 21: 367-373.
3. ALISON, M. Liver stem cells: a two compartment system. **Current Opinion in Cell Biology**. 1998; 10: 710-715.
4. ALVES, V. A. F.; BACCHI, C. E.; VASSALO, J. **Manual de Imunohistoquímica**. 1ed. São Paulo, 1999: 270.
5. ANDRADE, R.; LUCENA, M. I.; FERNADEZ, M. C.; GONZALEZ, M. Fatal Hepatitis Associated with Nimesulide. **Journal of Hepatology**. 2000; 32 (1): 174.
6. BACCARANI, U.; ADANI, G. L.; SAINZ, M.; DONINI, A.; RISALITI, A.; BRESADOLA, F. Human hepatocyte transplantation for acute liver failure: state of the art and analysis of cell sources. **Transplantation Proceedings**. 2005; 37: 2702-2704.
7. BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P.; DESMOULIÈRE, A. The Role of Hepatic Stellate Cells in Liver Regeneration. **Journal of Hepatology**. 2004; 40: 1023-1026.

8. BERK, J. E., HAUBRICH, W. S., KALSER, M. H., ROTH, J. L. A., SCHAFFNER, F. **Gastroenterologia – Fígado**. 4ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1991: 896.
9. BERNAL, W.; WENDON, J. Liver transplantation in adults with acute liver failure. **Journal of Hepatology**. 2004; 40 (2): 192-197.
10. BERNAL, W.; WENDON, J. Acute Liver Failure. **Current Opinion in Anaesthesiology**. 2000; 13 (2): 113-118.
11. BHADURI, B. R.; MIELI-VERGANI, G. Fulminant Hepatic Failure: Pediatric Aspects. **Seminars in Liver Disease**. 1996; 16 (4): 349-356.
12. BHATI, C. S.; STARKEY, G.; BHATT, A. N.; HUBSCHER, S. G.; BRAMHALL, S. R. Acute liver failure due to primary angiosarcoma: a case report and review of literature. **World Journal of Surgical Oncology**. 2008; 6 (1):104
13. BLEI, A. T. Selection for acute liver failure: have we got it right? **Liver Transplantation**. 2005; 11(suppl1): S30-S34.
14. BURT, A. D.; PATH, M. R. C.; LE BAIL, B.; BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P. Morphologic Investigation of Sinusoidal Cells. **Seminars in Liver Disease**. 1993; 13 (1): 21-35.
15. BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater – Histologia funcional**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994: 271-278.

16. CIOCCA, M.; MOREIRA-SILVA, S. F.; ALEGRÍA, S.; GALOPPO, M. C.; RUTTIMAN, R. Hepatitis A as an etiologic agent of acute liver failure in Latin America. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 2007; 26 (8): 711-715.
17. COURT, F. G.; WEMYSS-HOLDEN, S. A.; DENNISON, A. R.; MADDERN, G. J. The mystery of liver regeneration. **British Journal of Surgery**. 2002; 89: 1089-1095.
18. CRAWFORD, J. M. O fígado e o trato biliar. *In*: COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; 759-808.
19. CROSBY, H. A.; NIJJAR, S.; GOYET, J.; KELLY, D. A.; STRAIN, A. J. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 397-403.
20. CROSBY, H. A.; KELLY, D. A.; STRAIN, A. J. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. **Gastroenterology**. 2001; 120: 534-544.
21. DABEVA, M. D.; SHAFRITZ, D. A. Hepatic Stem Cells and Liver Repopulation. **Seminars in Liver disease**. 2003; 23 (4): 349-362.
22. DHAWAN, A.; MIELI-VERGANI, G. Acute liver failure in neonates. **Early Human Development**. 2005; 81: 1005-1010.
23. DURAND, P.; DEBRAY, D.; MANDEL, R.; BAUJARD, C.; BRANCHEREAU, S.; GAUTHIER, F.; JACQUEMIN, E.; DEVICTOR, D.

- Acute Liver Failure in Infancy: A 14-year Experience of a Pediatric Liver Transplantation Center. **The Journal of Pediatrics**. 2001; 139 (6): 871-876.
24. ESCORSELL, A.; MAS, A.; DE LA MATA, M. **Liver Transplantation**. 2008; 13 (10):1389-1395.
25. FAUSTO, N. Liver regeneration. **Journal of Hepatology**. 2000; 32 (suppl. 1): 19-31.
26. FAUSTO, N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. **Liver Transplantation**. 2001; 7 9100: 835-844.
27. FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. **Hepatology**. 2004; 1477-1487.
28. FAUSTO, N. Tweaking liver progenitor cells. **Nature Medicine**. 2005; 11(10): 1053-1054.
29. FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mechanisms of Development**. 2003; 120:117-130.
30. FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**. 2006; 43: S45-S53.
31. FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **FASEB Journal**. 1995; 9: 1527-1536.

32. FAUSTO, N.; RIEHLE, K. J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. **Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery**. 2005; 12: 181-189.
33. FONTANA, R. J. Acute liver failure including acetaminophen overdose. **Medical Clinics of North America**. 2008; 92 (4): 761-794.
34. GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 344-355.
35. GILL, R. Q.; STERLING, R. K. Acute Liver Failure. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 2001; 33 (3): 191-198.
36. GOLDSTEIN, N. S.; SILVERMAN, J. F. Immunohistochemistry of the Gastrointestinal Tract, Pancreas, Bile Ducts, Gallbladder and Liver. *In*: DABBS, D. J. **Diagnostic Immunohistochemistry**. USA: Churchill Livingstone, 2002; 333-406.
37. GOW, P. J.; JONES, R. M.; DOBSON, J. L.; ANGUS, P. W. Etiology and Outcome of Fulminant Hepatic Failure managed at an Australian Liver Transplant Unit. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2004; 19 (2): 154-159.
38. GUO, M. HAY, B. A. Cell proliferation and apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**. 1999; 11: 745-752.
39. HIRAMATSU, A.; TAKAHASHI, S.; AIKATA, H.; AZAKAMI, T.; KATAMURA, Y; KAWAOKA, T. Etiology and outcome of acute liver failure:

- retrospective analysis of 50 patients treated at a single center. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2008; 23 (8):1216-1222.
40. HODGSON, H. Liver cells: biology to therapeutics. **Clinical Medicine**. 2003; 3 (2): 161-165.
41. JAKUBOWSKI, A.; AMBROSE, C.; PARR, M.; LINCECUM, J. M.; WANG, M. Z.; ZHENG, T. S.; BROWNING, B.; MICHAELSON, J. S.; BAESTCHER, M.; WANG, B.; BISSELL, D. M.; BURKLY, L. C. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. **The Journal of Clinical Investigation**. 2005; 115 (9): 2330-2340.
42. JALAN, R. Acute liver failure: current management and future prospects. **Journal of Hepatology**. 2005; 42: S115-S123.
43. JANG, Y.; SHARKIS, S. J. Metamorphosis from bone marrow derived primitive stem cells to functional liver cells. **Cell Cycle**. 2004; 3(8): 980-982.
44. KATOONIZADEH, A.; NEVES, F.; VERSLYPE, C.; PIRENNE, J.; ROSKAMS, T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. **Liver International**. 2006; 26:1225-1233.
45. KAY, M. A.; FAUSTO, N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies. **Molecular Medicine Today**. 1997; 108-115.
46. KHAN, A.Z.; MUDAN, S. S. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. **AZN Journal of Surgery**. 2007; 77 (1-2): 9-14.

47. KHASHAB, M.; TECTOR, A. J.; KWO, P. Y.; Epidemiology of acute liver failure. **Current Gastroenterology Reports**. 2007; 9 (1): 66-73.
48. KLATSKIN, G.; CONN, H. O. **Histopathology of the Liver- vol.1**. 1st.ed. Oxford: Oxford University Press, 1993: 459.
49. KONIARIS, L. G.; McKILLOP, I. H.; SCWARTZ, S. I.; ZIMMERS, T. A. Liver Regeneration. **Journal of the American College of Surgeons**. 2003; 197 (4): 634-659.
50. LACONI, E.; LACONI, S. Principles of hepatocyte repopulation. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 433-438.
51. LARSON, A. M.; POLSON, J.; FONTANA, R. J.; DAVERN, T. J.; LALANI, E. Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure: Results of a United States Multicenter, Prospective Study. **Hepatology**. 2005; 42 (6): 1364-1372.
52. LEE, W. M. Acetaminophen and the U. S. acute liver failure study group: lowering the risks of hepatic failure. **Hepatology**. 2004; 40 (1): 6-9.
53. LEE, W. M. Acute Liver Failure in the United States. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (3): 217-226.
54. LEE, W. M. Medical Progress: Acute Liver Failure. **The New England Journal of Medicine**. 1993; 329 (25): 1862-1872.
55. LEE, W. M. Etiologies of acute liver failure. **Seminars in Liver Disease**. 2008; 28 (2):142-152.

56. LEE, W. M.; SEREMBA, E. Etiologies of acute liver failure. **Current Opinion in Critical Care**. 2008; 14 (2): 198-201.
57. LIBBRECHT, L.; ROSKAMS, T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 389-396.
58. LOSSER, M.; PAYEN, D. Mechanisms of Liver Damage. **Seminars in Liver Disease**. 1996; 16 (4): 357-368.
59. LOWES, K. N.; CROAGER, E. J.; OLYNYK, J. K.; Oval cell-mediated liver regeneration: role of cytokines and growth factors. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2003; 18:4-12.
60. MACSWEEN, R. N. M.; ISHAK, K. G.; ANTHONY, P. P.; SCHEUER, P. J.; BURT, A. D.; PORTMAN, B. C.; **Pathology of the liver**. Churchill Livingstone, 2002.
61. MALIK, R.; SELDEN, C.; HODGSON, H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 425-431.
62. MANGNALL, D.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. **Liver International**. 2003; 23 (2): 124-138.
63. MARTIN, J. L.; KEEGAN, M. T.; VASDEV, G. M. S.; NYBERG, S. L.; BOURDI, M.; POHL, L. R.; PLEVAK, D. J. Fatal Hepatitis Associated with Isoflurane Exposure and CYP2A6 Autoantibodies. **Anesthesiology**. 2001; 95 (2): 551-553.

64. MITAKA, T. Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2001; 281: 1-5.
65. MITCHELL, C. FAUSTO, N. Bone marrow-derived hepatocytes. Rare but promising. **American Journal of Pathology**. 2002; 161 (2): 349-350.
66. MOHANTY, S. R.; LABRECQUE, D. R.; MITROS, F. A.; LAYDEN, T. J. Liver Transplantation for Disulfiram-induced Fulminant Hepatic Failure. **Journal of Gastroenterology**. 2004; 38 (3): 292-295.
67. MONTALBANO, M.; SLAPAK-GREEN, G. I.; NELF, G. W. Fulminant Hepatic Failure from Herpes Simplex Virus: Post Liver Transplantation Acyclovir Therapy and Literature Review. **Transplantation Proceedings**. 2005; 37: 4393-4396.
68. MUDAWI, H. M. Y.; YOUSIF, B. A. Fulminant Hepatic Failure in an African Setting> Etiology, Clinical Course, and Predictors of Mortality. **Digestive Disease and Sciences**. 2007; 52: 3266-3269.
69. NGUYEN, L. N.; FURUYA, M. H.; WOLFRAIM, L. A.; NGUYEN, A. P.; HOLDREN, M. S. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. **Hepatology**. 2007; 45(1): 31-41.
70. O'GRADY, J. G.; PORTMANN, B.; WILLIAMS, R. Fulminant Hepatic Failure. *In*: SCHIFF, L., SCHIFF, E. R. **Diseases of the liver**. 7th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1993; 1077-1090.
71. OH, S.; HATCH, H. M.; PETERSEN, B. E. Hepatic oval "stem" cell in liver regeneration. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 405-409.

72. OSTAPOWICZ, G.; LEE W. M. Acute hepatic failure: a Western perspective. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2000; 15:480-488.
73. PAHLAVAN, P. S.; FELDMANN, JR., R. E.; ZAVOS, C.; KOUNTOURAS, J. Prometheus Challenge: Molecular, Cellular and Systemic Aspects of Liver Regeneration. **Journal of Surgical Research**. 2006; 134: 238-251.
74. PALMES, D.; SKAWRAN, S.; SPIEGEL, H. Acute liver failure: from bench to bedside. **Transplantation Proceedings**. 2005; 37: 1628-1631.
75. PAWLOWSKI, R.; JURA, J. ALR and Liver regeneration. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2006; 288: 159-169.
76. PARENT, R.; MARION, M.; FURIO, L.; TRÉPO, C.; PETIT, M. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. **Gastroenterology**. 2004; 126: 1147-1156.
77. PÉRON, J. M.; BUREAU, C.; POIRSON, H.; MANSUY, J. M.; SELVES, J.; VINEL, J. P. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. **Journal of Viral Hepatitis**. 2007, 14 (5): 298-303.
78. PONIACHIK, J.; QUERA, R.; LUI, A.; Insuficiência hepática fulminante. **Revista Médica de Chile**. 2002; 130(6): 691-698.
79. QUARESMA, J. A. S. Arboviroses da Amazônia: estudo do mecanismo de morte celular e da resposta fenotípica do hospedeiro na febre amarela. 2003; 19-37.

80. RIORDAN, S. M.; WILLIAMS, R. C. B. E. Mechanisms of Hepatocyte Injury, Multiorgan Failure, and Prognostic Criteria in Acute Liver Failure. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (3): 203-215.
81. ROSKAMS, T.; VOS, R.; EYKEN, P. V.; MYAZAKI, H.; DAMME, B. V.; DESMET, V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. **Journal of Hepatology**. 1998; 29 (3): 455-463.
82. ROSKAMS, T. A.; LIBBRECHT, L.; DESMET, V. J. Progenitors Cells in Diseased Human Liver. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (4): 385-396.
83. ROZGA, J. Liver support technology – an update. **Xenotransplantation**. 2006; 13: 380-389.
84. RUTHERFORD, A.; CHUNG, R. T. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. **Seminars in Liver Disease**. 2008; 28 (2): 167-174.
85. SANTONI-RUGIU, E.; JELNES, P.; THORGEIRSSON, S. S.; BISGAARD, H. C. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. **APMIS: Acta Pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. 2005; 113 911-12): 876-902.
86. SASS, D.; SHAKIL, A. O. Fulminant hepatic failure. **Liver Transplantation**. 2005; 11(6): 594-605.

87. SCHATNER, A.; SOKOLOVSKAYA, N.; COHEN, J. Fatal Hepatitis and Renal Failure During Treatment with Nimesulide. **Journal of Internal Medicine.** 2000; 247 (1): 153-155.
88. SCHEUER, P. J.; LEFKOWITCH, J. H. **Liver Biopsy Interpretation.** 6 ed.: W. B. Saunders, 2000; 369.
89. SCHIODT, F. V.; DAVERN, T. J.; SHAKIL, A. O.; McGUIRE, B.; SAMUEL, G.; LEE, W. M. Viral Hepatitis-Related Acute Liver Failure. **The American Journal of Gastroenterology.** 2003; 98 (2): 448-453.
90. SCHMID, R. Stem cells: a dramatic new therapeutic tool. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.** 2002; 17:636-642.
91. SELL, S.; Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. **Hepatology.** 2001; 33 930: 738-750.
92. SELL, S. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** 2003; 35: 267-271.
93. SEN, S.; WILLIAMS, R. New liver support devices in acute liver failure: a critical evolution. **Seminars in Liver Disease.** 2003; 23 (3): 283-294.
94. SENOO, H. Structure and function of hepatic stellate cells. **Medical Electron Microscopy.** 2004; 37:3-15.
95. SHAFRITZ, D. A.; DABEVA, M. D.; GROMPE, M. Liver Repopulation through Cell Transplantation. *In:* ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.;

- CHISARI, F. V.; SCHACHTER, D. **The Liver- Biology and Pathobiology**. 4ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 927-940.
96. SHERLOCK, S. **Diseases of the liver and biliary system**. 8th ed.: Blackwell scientific publications, 1989; 749.
97. SKOULIDIS, F.; ALEXANDER, G. J.M.; DAVIES, S. E. Ma huang associated acute liver failure requiring liver transplantation. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2005; 17:581-584.
98. SQUIRES, R. H. Acute liver failure in children. **Seminars in Liver Disease**. 2008; 28 (2): 153-166.
99. STRAIN, A. J. Hepatic Stem Cells – Recent Advances in Understanding Liver Growth and Development. **Gut**. 1997; 41(4S): 46A.
100. STRAIN, A. J.; CROSBY, H. A.; NIJJAR, S.; KELLY, D. Human Liver-derived Stem Cells. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (4): 373-384.
101. SUSICK, R.; MOSS, N.; KUBOTA, H.; LECLUYSE, E.; HAMILTON, G.; LUNTZ, T.; LUDLOW, J.; FAIR, J.; GERBER, D.; BERGSTRAND, K.; WHITE, J.; BRUCE, A.; DRURY, O.; GUPTA, S.; REID, L. M. Hepatic Progenitors and Strategies for Liver Cell Therapies. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2001; 944: 398-419.
102. 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**. 2002; 22: 365-373.

103. TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; CASTRO E SILVA, T.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; CASTRO E SILVA, O.; ZUCOLOTO, S. A Molecular View of Liver Regeneration. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2006; 21 (1): 58-62.
104. TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; CASTRO E SILVA, T.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; CASTRO E SILVA, O.; ZUCOLOTO, S. Cellular aspects of liver regeneration. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 2006; 21 (1): 63-66.
105. TAUB, R. Liver Regeneration: from Myth to Mechanism. **Molecular Cell Biology. Nature Reviews**. 2004; 5: 836-847.
106. THEISE, N. D.; KRAUSE, D. S. Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 411-417.
107. THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Overview of Recent Experimental Studies on Liver Stem Cells. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (4): 303-312.
108. TREEM, W. R. Fulminant Hepatic Failure in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutritional**. 2002; 35 (supp. 1): S33-S38.
109. VENTO, S.; GAROFANO, T.; RENZINI, C.; CAINELLI, F.; CASALI, F.; GHIRONZI, G. Fulminant Hepatitis Associated with Hepatitis A virus Superinfection in Patients with Chronic Hepatitis C. **The New England Journal of Medicine**. 1998; 338 (5): 286-290.

110. ZHENG, Y.; TANIGUCHI, H. Diversity of Hepatic Stem Cells in the Fetal and Adult Liver. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (4): 337-348.
111. ZIMMERMANN, A. Regulation of Liver regeneration. **Nephrology Dialysis Transplantation**. 2004; 19 (suppl4): iv6-iv9.
112. WEBER, A. Immortalization of hepatic progenitor cells. **Pathologie Biologie**. 2004; 52: 93-96.
113. WEI, G.; BERGQUIST, A.; BROOMÉ, U. LINDGREN, S.; WALLERSTEDT, S. Acute liver failure in Sweden: etiology and outcome. **Journal of Internal Medicine**. 2007; 262(3):393-401.
114. WILLIAMS, R. Classification, Etiology, and Considerations of Outcome in Acute Liver Failure. **Seminars in Liver Disease**. 1996; 16 (4): 343-348.
115. WILLIAMS, R.; RIORDAN, S. M. Acute liver failure: established and putative hepatitis viruses and therapeutic implications. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2000; 15 (suppl): G17-G25.
116. WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J.P. Kupffer cells: Their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. **Seminars in Liver Disease**. 1993; 13 (1): 50-56.
117. WRIGHT, C. N. Stem cell in tissue engineering and transplantation. **Histopathology**. 2002; 41(suppl.2): 222-226.

Objetivos

Uma vez ressaltados o alto risco de mortalidade e resultados pouco promissores aos esquemas terapêuticos existentes para falência hepática aguda, este projeto tem como objetivo estudar os componentes celulares que participam do processo de regeneração hepática na FHA por meio de:

- ✓ Caracterização e quantificação dos tipos celulares do componente epitelial do parênquima hepático;
- ✓ Investigação da presença de células ovais;
- ✓ Estabelecimento do índice de proliferação celular;
- ✓ Caracterização e quantificação de algumas células mesenquimais.

Resumo

A falência hepática aguda (FHA) é uma síndrome caracterizada por hepatite aguda grave complicada pelo rápido aparecimento de encefalopatia hepática. As etiologias reconhecidas são infecções virais, reações a fármacos, doenças metabólicas, doenças infiltrativas, hepatite auto-imune, afecções isquêmicas e uma considerável proporção de casos com etiologia não definida. O prognóstico da FHA é bastante reservado, sendo o transplante hepático a única forma efetiva de tratamento no momento. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar os componentes celulares que participam do processo de regeneração hepática na FHA. Foram utilizados 19 casos de fígados com FHA, 10 oriundos de autópsias e 9 oriundos de explantes; foram incluídos 10 casos de fígados controle histologicamente normais de autópsias. Foram confeccionados 2 blocos de parafina pela técnica de tissue microarray dos 19 casos de FHA e 10 controles. Esses blocos foram cortados e corados com Hematoxicilina-Eosina, Tricrômico de Masson e Picrossirius red para avaliação semi-quantitativa histológica. Foram imunomarcados com HepPar 1, CK7, CK19, CD34, 1A4, CD68 e Ki67 para avaliação quantitativa das populações celulares presentes na FHA. À avaliação semi-quantitativa das lesões dos casos de FHA observaram-se alterações histológicas similares às relatadas na literatura, mas chamaram a atenção a presença de infiltrado inflamatório mononuclear composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de raros eosinófilos. As colorações pelo tricrômico de Masson e Picrossirius red evidenciaram a presença de fibrose incipiente nas áreas de necrose e de proliferação ductal/ductular. Na avaliação quantitativa todos os marcadores imuno-histoquímicos revelaram diferenças estatisticamente significativas das variáveis estudadas dos casos de FHA em relação aos controles, exceto o CD34 e Ki67. Houve redução dos hepatócitos e aumento de todas as demais variáveis. Houve relação de dependência entre as variáveis 1A4 e CK7, indicando aumento de atividade das células estreladas nas áreas de proliferação ductal.

Abstract

Introdução

A falência hepática aguda (FHA) é uma alteração hepática rara que foi definida pela primeira vez em 1970 por Trey e Davidson, como sendo uma síndrome caracterizada por hepatite aguda grave complicada pelo rápido desenvolvimento de encefalopatia hepática (GILL & STERLING, 2001; SASS & SHAKIL, 2005).

Há perda abrupta das funções metabólicas e da capacidade de síntese de diversas substâncias pelo fígado, progredindo rapidamente para a disfunção de múltiplos órgãos e a morte do indivíduo pode ocorrer mesmo quando o fígado começa a se recuperar (BERNAL & WENDON, 2000).

O tempo decorrente entre a instalação do quadro hepático agudo e a manifestação de encefalopatia hepática determina a classificação da falência hepática em fulminante ou sub-fulminante (MACSWEEN et al, 2002).

Diversas agressões hepáticas podem levar a FHA (LEE, 2008). As etiologias variam nas diferentes partes do mundo, porém, a maioria dos casos está relacionada à etiologia viral, ou a fármacos (FONTANA, 2008) e toxinas, sendo que uma significativa porcentagem dos casos de FHA permanece sem etiologia definida (KLATSKIN & CONN, 1993; SASS & SHAKIL, 2005).

Outras causas de FHA incluem neoplasias; alterações metabólicas e/ou genéticas como a intolerância hereditária à frutose, Doença de Wilson, deficiência de Alfa1 antitripsina; esteatose aguda da gravidez; alterações vasculares como a Síndrome de Budd-Chiari e doença veno-oclusiva e outras como as hepatites auto-imunes (WILLIAMS, 1996; OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

Nos pacientes pediátricos podem-se citar hepatites neonatais de diferentes etiologias (TREEM, 2002), hepatite auto-imune, intoxicação por fármacos e doenças metabólicas inerentes à infância como tirosinemia hereditária, galactosemia, hemocromatose neonatal e erros do metabolismo de ácidos biliares entre outros, como possíveis etiologias, sendo que grande parte dos casos apresenta etiologia não definida (DURAND, 2001; TREEM, 2002; LEE, 2003).

Os principais vírus causadores da FHA são os vírus das hepatites A e E, podendo-se citar ainda o citomegalovírus, o herpes simples e vírus relacionados com febre hemorrágica (OSTAPOWICZ & LEE, 2000).

Dentre os fármacos tem destaque o paracetamol (acetaminofen) em alguns países como os EUA e o Reino Unido, além de muitos outros incluindo halotano (WILLIAMS, 1996), isofluorano (MARTIN et al, 2001), inibidores da monoaminoxidase, antiinflamatórios não esteróides (WILLIAMS, 1996; ANDRADE et al, 2000; SCHATNER et al, 2000), valproato de sódio, sulfonamidas, fenitoína, cetoconazol (WILLIAMS, 1996) e disulfiram (MOHANTY et al, 2004) entre outros, que têm sido implicados como agentes que levam a FHA. A droga Ecstasy é reconhecida como causadora de efeito hepatotóxico direto que pode levar a falência hepática aguda (BERNAL & WENDON, 2000).

Os sinais clínicos finais da FHA independem da etiologia e incluem alterações nas enzimas hepáticas, icterícia, coagulopatia, encefalopatia, hipotensão e insuficiência renal aguda, além de maior suscetibilidade a infecções evoluindo para falência de múltiplos órgãos (LEE, 2003).

Macroscopicamente, o fígado pode estar reduzido em tamanho, com comprometimento difuso e mais ou menos uniforme, apresentando superfície de corte amarelada ou avermelhada, podendo ser visualizadas áreas com parênquima totalmente colapsado alternando-se com nódulos grandes de parênquima preservado ou em regeneração (O'GRADY et al, 1993; BURKITT et al, 1994).

Microscopicamente caracteriza-se por extensa necrose dos hepatócitos, mas pode apresentar manifestações clínicas de falência hepática aguda sem necrose como na síndrome de Reye e na esteatose aguda da gravidez (LEE, 1993).

O quadro histopatológico típico é representado por necrose hepatocelular de coagulação, panlobular, em geral, com preservação da arquitetura hepática. Outras alterações incluem colapso lobular, ilhas de hepatócitos remanescentes ou regenerativos, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e/ou eosinófilos e proliferação de estruturas semelhantes a ductos, próximo aos

espaços porta (CRAWFORD, 2000; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; GARTNER & HIATT, 2001).

O prognóstico da FHA é reservado, sendo o transplante hepático a forma emergencial de tratamento com maior impacto na sobrevivência dos pacientes, aonde 80% destes vão a óbito quando não realizado o transplante (GOW et al, 2004; SASS & SHAKIL, 2005).

O transplante hepático, entretanto, beneficia número limitado de pacientes devido à quantidade deficitária de órgãos disponíveis, além de ser de alto custo, com considerável taxa de mortalidade decorrente do próprio procedimento e na maioria dos casos requerendo terapia imunossupressiva de longa duração que pode trazer complicações (KAY & FAUSTO, 1997; SHAFRITZ et al, 2001).

A regeneração hepática é um processo de múltiplos passos, que envolve a atuação de numerosas citocinas, fatores de crescimento, fatores metabólicos e ativação de genes (FAUSTO, 2005; FAUSTO et al, 2006).

Os tipos celulares envolvidos diretamente no processo de regeneração hepática são as células com capacidade proliferativa (hepatócitos maduros e células ovais) e as células que atuam produzindo substâncias capazes de promover a proliferação, como as células de Kupffer (CK) e as células hepáticas estreladas (CHE) (JAKUBOWSKI et al, 2005).

Os hepatócitos constituem a linha de frente na resposta a injúria ou ressecção parcial, porém, quando o fígado é gravemente agredido resultando em perda considerável de sua massa celular e a proliferação dos hepatócitos fica lenta ou inibida, um segundo compartimento de reserva proliferativo, o das células ovais, que se encontra quiescente é ativado (KHAN & MUDAN, 2007).

Uma vez ressaltados o alto risco de mortalidade e resultados pouco promissores aos esquemas terapêuticos existentes para falência hepática aguda, este trabalho tem como objetivo estudar os componentes celulares que participam do processo de regeneração hepática na FHA.

Casuística, Material e Métodos

CASUÍSTICA E INCLUSÃO DOS CASOS

Utilizando-se o diagnóstico anatomopatológico e resumo clínico contidos nos laudos do arquivo de autópsias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP no período compreendido entre 1983 e 2004, foram selecionados 10 casos com diagnóstico de falência hepática aguda fulminante (FHA) e 10 casos de fígados histologicamente normais.

Foi realizado levantamento do arquivo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e incluído um terceiro grupo constando de 10 casos de fígados explantados com diagnóstico de FHA.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Construção de blocos de “array” de tecido (“tissue microarray” - TMA)**

Foram construídos blocos de parafina do tipo “tissue microarray” (TMA) utilizando-se um “arrayer” de tecido biológico produzido pela Beecher Instruments, Sun Prairie, EUA (Figura 1). Essa técnica permite a inclusão de grande número de casos em um mesmo bloco de parafina, que ficam representados por cilindros de tecidos, cujo diâmetro pode variar de 0,6 a 2,0 mm, espaçados entre si a uma distância de 1,0 mm, tanto na horizontal quanto na vertical. No presente trabalho, cada caso está representado por 2 cilindros de tecido consecutivos obtidos a partir dos blocos de parafina “doadores” (blocos originais contendo a alteração), com diâmetro de 2,0 mm. A retirada dos cilindros do bloco de parafina “doador” e sua inclusão no bloco de parafina “receptor” (bloco de TMA) é realizada com a ajuda de agulhas especiais. Os cilindros ou amostras de todos os casos incluídos no estudo foram distribuídos em 2 blocos “receptores” (Figura 2); os casos são identificados em um mapa de TMA, que registra a disposição e localização dos casos.

Ilustrações – Material e Métodos: confecção dos blocos de TMA

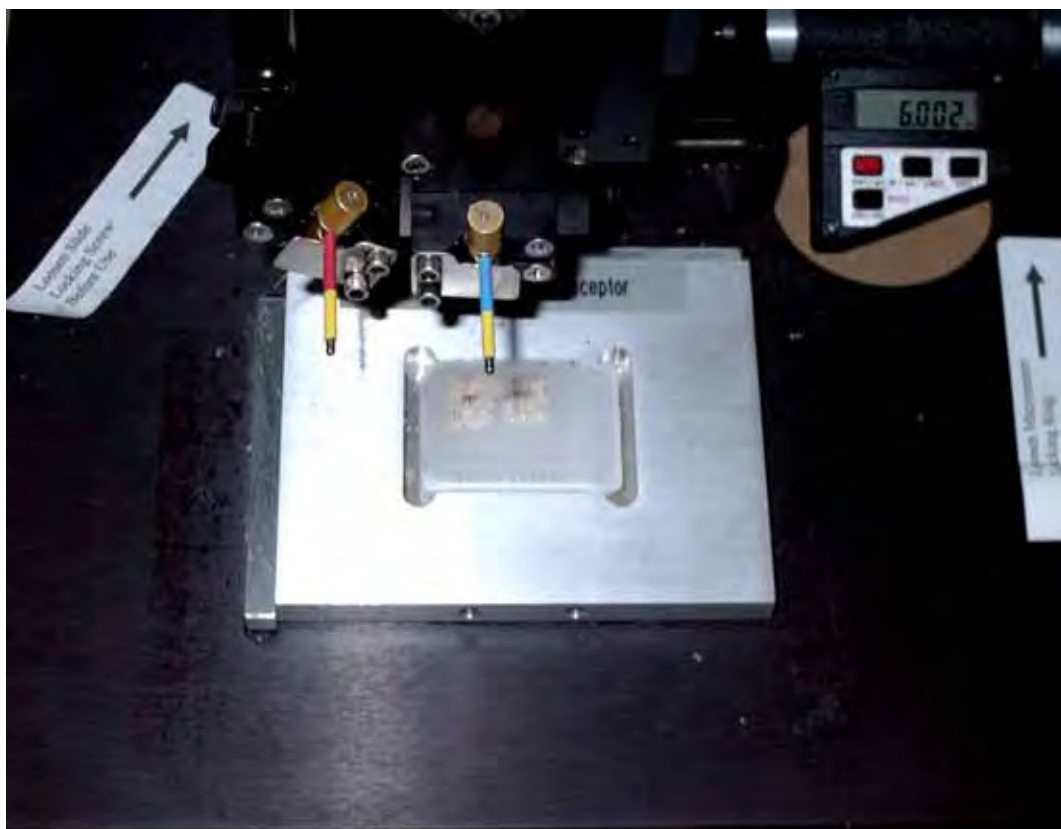


Figura 1: Fotografia do “array” de tecido utilizado na construção dos blocos de TMA.

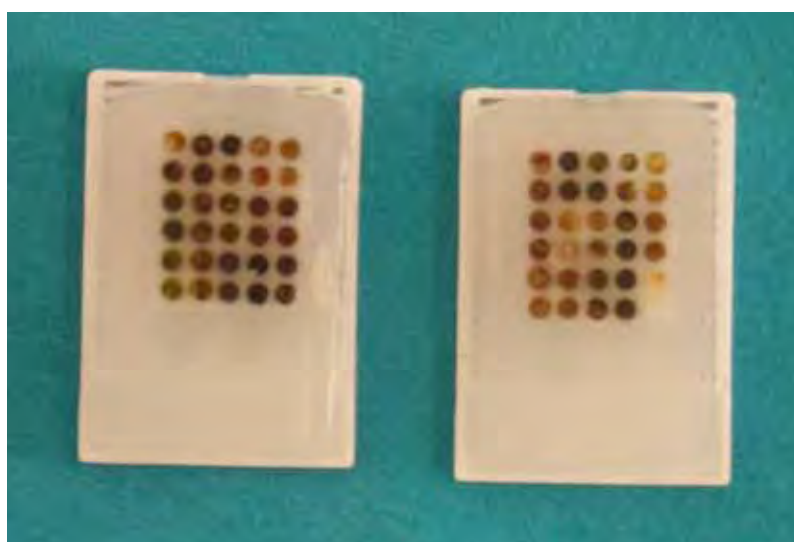


Figura 2: Fotografia dos blocos de TMA.

- **Colorações**

Cortes histológicos seriados com espessura de 3 µm foram obtidos com micrótomo histológico de cada um dos blocos de TMA e utilizados para o estudo histoquímico e imuno-histoquímico.

As lâminas foram coradas pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson e Picrossirius Red, conforme ilustrado nas figuras 3 a 5.

Foram avaliadas as expressões imuno-histoquímicas de: CD34, actina de músculo liso, CD68, citoceratina 7, citoceratina 19 e antígeno de proliferação celular Ki-67. Empregou-se também o anticorpo monoclonal “hepatocyte paraffin-1” (HepPar-1).

Os cortes histológicos foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA, Cód. P7886) e mantidos a 60°C em estufa por 4 horas. A seguir, foi realizada a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico absoluto e lavagem com solução salina tamponada (PBS), com bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3%. Os métodos de recuperação de epítomos empregados variaram de acordo com o antígeno em investigação: pelo calor em panela de pressão (CD34 e antígeno Ki-67), vaporizador (actina de músculo liso) ou forno de microondas (com as lâminas incubadas em solução de citrato 0,01M pH 6,0 para CD68, citoceratina 7, citoceratina 19 e HepPar-1). Após a recuperação de epítomos, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários “overnight” a 4°C nas diluições apropriadas e, após nova lavagem em PBS, incubadas por 60 minutos com os respectivos anticorpos secundários (apenas para actina de músculo liso, CD68, citoceratina 7, citoceratina 19 e HepPar-1, com o emprego de anticorpos biotinilados anti-IgG de camundongo, 1:320, Vector, Burlingame, EUA, Cód. BA-2000), seguindo-se a utilização dos sistemas de detecção conforme instruções do fabricante (Novolink Polímero, Novocastra, Norwell, EUA, Cód. 7161, para CD34, antígeno Ki-67; ABC Elite, Vector, Burlingame, EUA, Cód. PK-6100, para actina de

músculo liso, CD68, citoceratina 7, citoceratina 19 e HepPar-1; Envision Rabbit, DAKO, Carpinteria, EUA, e Envision Mouse, DAKO, Carpinteria, EUA, Cód. K4001,) e finalização com tratamento por solução de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, EUA, Cód. D5637 1 mg/mL + Tris-HCl 1M pH 7,4) acrescida de H₂O₂ (concentração final 0,2%), contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA, Cód. SP15-500). Detalhes sobre os antígenos/anticorpos primários, diluições do anticorpo primário e fabricantes estão referidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Especificações dos antígenos, clones dos anticorpos primários, suas diluições e fabricantes empregados no estudo imuno-histoquímico

ANTÍGENO	CLONE	DILUIÇÃO	FABRICANTE
Actina de músculo liso	1A4	1:400	Zymed
CD68	KP1	1:6000	DAKO
CD34	My10	1:400	BD Biosciences
Citoceratina 7	OV-TL 12/30	1:1000	DAKO
Citoceratina 19	BA17	1:1600	DAKO
Ki-67	MIB-1	1:4800	DAKO
Anticorpo HepPar-1	OCH1E5	1:100	DAKO

DAKO (Carpinteria, EUA), Zymed (San Francisco, EUA), BD Biosciences (San Jose, EUA), Neomarkers (Fremont, EUA), Santa Cruz (Santa Cruz, EUA)

Ilustrações – Material e Métodos - Lâminas



Figura 3 – Lâmina confeccionada a partir do bloco de TMA, com corte histológico corado por tricrômico de Masson.

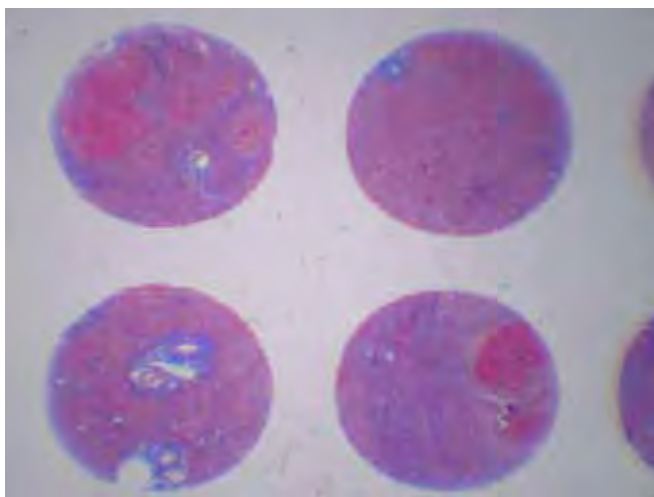


Figura 4 – Lâmina da figura anterior em maior aproximação (LUPA).

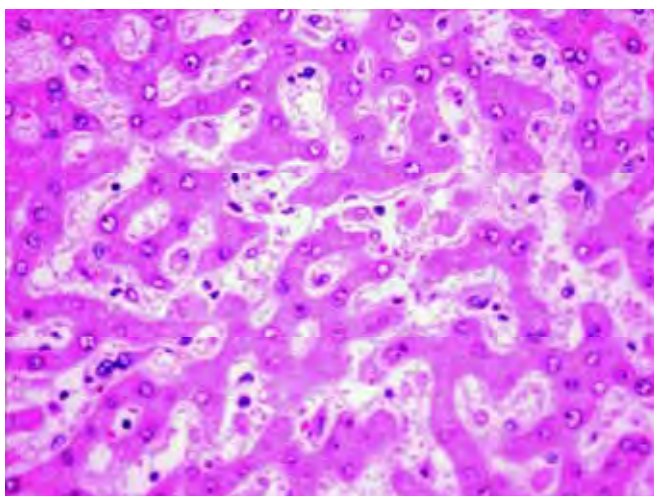


Figura 5 – *Fígado controle*: compartimento intralobular com traves hepatocelulares e sinusóides (HE – 200X)

Avaliação Histológica – Semi-quantitativa

Os cortes histológicos corados pelas técnicas de HE, tricrômico de Masson e Picrosirius red foram submetidos à análise semi-quantitativa por microscopia óptica dos seguintes parâmetros:

- Avaliação das alterações hepatocelulares: colestase, degeneração hidrópica e extensão da necrose;
- Avaliação da presença de infiltrado inflamatório;
- Avaliação da presença de fibrose;
- Avaliação da presença de hiperplasia ductal.

As lesões foram graduadas de 0 a 4 cruzes, sendo 0: ausentes, 1: presença mínima, 2: presença discreta, 3: presença moderada, 4: presença intensa dos parâmetros em questão.

Avaliação Imuno-histoquímica

As lâminas submetidas às técnicas imuno-histoquímicas foram utilizadas para avaliação semi-quantitativa e nos casos onde houve indicação foi realizada também a avaliação quantitativa. Os imunomarcadores foram utilizados conforme segue abaixo:

- Ki-67 (MIB1) para avaliação de proliferação celular;
- Anticorpo HepPar1 para avaliação dos hepatócitos;
- CK7 e CK19 para avaliação do epitélio ductal e células ovais;
- CD34 para avaliação das células endoteliais e células ovais;
- CD68 para avaliação de células de Kupffer;
- alfa-actina de músculo liso (1A4) para avaliação de células hepáticas estreladas.

Para a quantificação, nos cortes imunomarcados com HepPar1, CK7, CK19, CD34, CD68 e 1A4, foi utilizado um sistema digitalizador e analisador de imagens, que é composto de microscópio óptico marca Nikon mod. Microphot FXA-B1 com motorização, sistema de fotodocumentação Polaroid, câmera CCD Sony e unidade de controle, câmera colorida CU7701 Hitache com unidade de controle e lentes para macro, unidade no-break FullBack, CPU IBM-PC compatível, monitor 17” e software analisador de imagens marca Carl Zeiss Vision mod. KS-300.

Por meio do digitalizador de imagens, foram capturadas imagens de 20 campos microscópicos, com objetiva 20X para cada caso para cada variável a ser estudada (hepatócitos, epitélio ductal, células de Kupffer, células hepáticas estreladas e células ovais), com o objetivo de quantificar as variáveis. Foram mantidos os padrões de iluminação, contraste, brilho e filtros coloridos para todos os campos de todas as lâminas examinadas. A área ocupada especificamente por cada variável estudada em cada campo digitalizado foi medida através da segmentação de

cores, uma propriedade do software, que identifica as estruturas desejadas baseado nas suas características de coloração (figuras 6 e 7).

Foi calculada a medida da área presente nos campos selecionados para cada variável, em micrômetros quadrados e a densidade morfométrica da área de cada variável (DM) foi expressa pela relação entre a área medida e a área total do campo digitalizado, conforme fórmula abaixo:

$$DM = \frac{\text{Área da variável imunomarcada}}{\text{Área total do campo digitalizado (109.495,21)}}$$

Ilustrações – Material e Métodos - Segmentação de cores no campo digitalizado

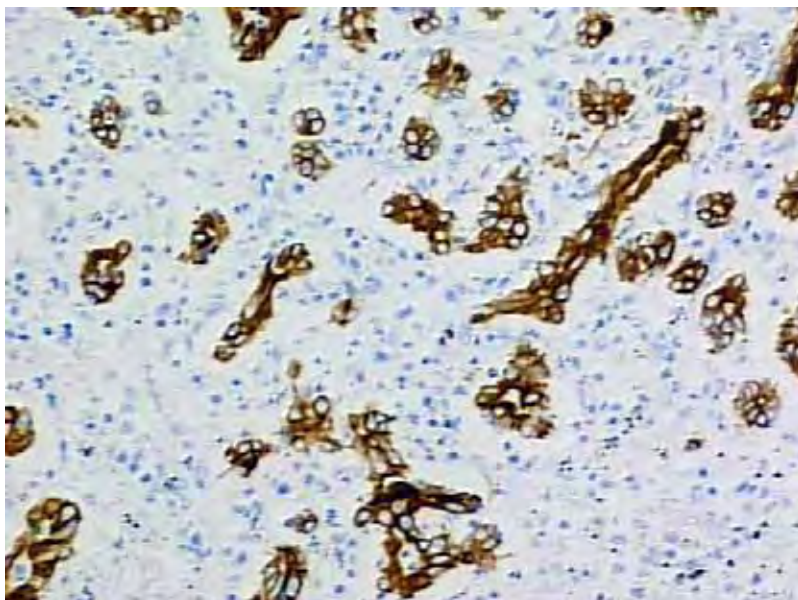


Figura 6 – *Fígado com FHA:* imunomarcção das células ductais com anticorpo CK19 (200X)

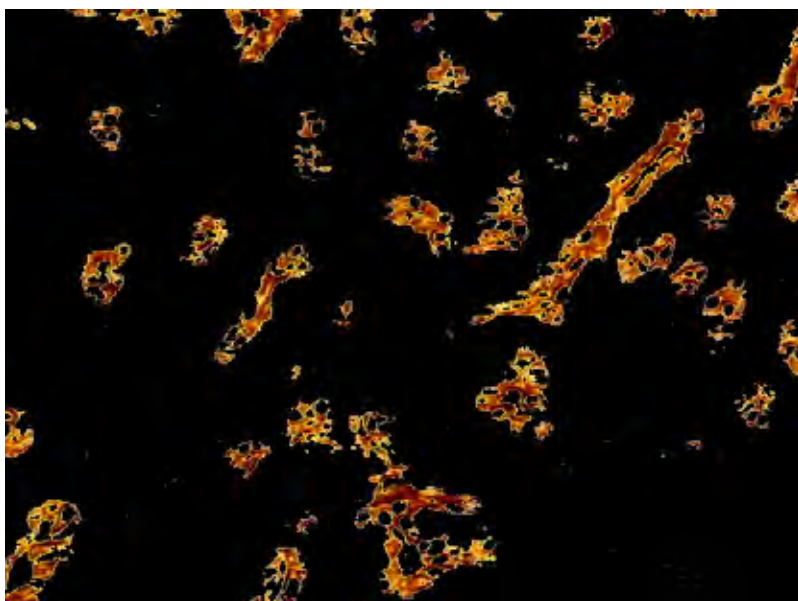


Figura 7 – *Fígado com FHA:* morfometria computadorizada da figura 6 - segmentação de cores (200X)

Análise Estatística

Todos os testes estatísticos foram realizados pelo programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation) com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

1. Análise prévia dos grupos FHA-UNESP e FHA-USP

Para testar se os resultados dos grupos de autópsia (FHA-UNESP) e de explante (FHA-USP) eram suficientemente homogêneos para constituir um único grupo e, assim serem comparados com o grupo controle, as variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Este mostrou que a distribuição dos dados obedece ao padrão esperado se eles tivessem sido retirados de uma mesma população com distribuição normal. Da mesma forma foi aplicado o teste de igualdade de variâncias, considerando-se que a relação entre as variâncias é significativa quando o p for maior do que 0,05.

2. Análise estatística descritiva

Os 19 casos do grupo FHA e os 10 casos do grupo controle tiveram o resultado de cada variável para cada paciente representado pela média das 20 medidas.

Foi realizada análise estatística descritiva para a densidade morfométrica da área marcada com o anticorpo HepPar (DMHepPar), densidade morfométrica da área marcada com CD68 (DMCD68), densidade morfométrica da área marcada com 1A4 (DM1A4), densidade morfométrica da área marcada com CD34 (DMCD34), densidade morfométrica da área marcada com CK7 (DMCK7) e densidade morfométrica da área marcada com CK19 (DMCK19) dos grupos de FHA e controle. Essa análise incluiu as medidas de tendência central (média e mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão, coeficiente de variação, valores máximo e mínimo, 25° e 75° percentis e distância interquartil).

3. Análise estatística inferencial

Testou-se inicialmente a normalidade dos grupos FHA e controle para cada variável medida e a igualdade de variâncias entre os grupos FHA e controle para cada variável. A variável DM1A4 passou nesses testes e foi aplicado o teste t de Student. As DMHepPar, DMCD68, DMCD34, DMCK7 e DMCK19 dos dois grupos não passaram no teste de igualdade de variâncias e suas medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

Foi realizado para os grupos de FHA e controle teste de correlação linear múltipla, onde DMCK7 foi tomada como variável dependente e as variáveis DMHepPar, DMCD68, DM1A4, DMCD34, DMCK7 e DMCK19 foram tomadas como variáveis independentes.

A significância dos coeficientes de regressão parcial de cada variável independente foi testada pelo teste t. Quando o p do erro α de t foi estatisticamente significativo, considerou-se que essa variável pode predizer a variável dependente.

Resultados

Os resultados foram avaliados utilizando-se 10 casos de FHA oriundos de autópsias da FMB-UNESP, 9 casos de FHA oriundos de explante da FM-USP e 10 casos de fígados histologicamente normais.

Foi necessário excluir um dos casos selecionados da FM-USP porque após sua inclusão no “tissue microarray”, a análise das lâminas demonstrou que o material não corou com a imunomarcagem.

AValiação Histológica e Semi-Quantitativa

As variáveis semi-quantitativas estudadas e as medianas encontradas para suas respectivas graduações estão apresentadas no quadro 1, sendo 0: ausentes, 1: presença mínima, 2: presença discreta, 3: presença moderada, 4: presença intensa dos parâmetros em questão.

Quadro 1: medianas das variáveis da análise histopatológica semi-quantitativa para os grupos falência hepática aguda (FHA) e controle.

VARIÁVEL	MEDIANA	
	FHA	CONTROLE
Extensão da Necrose	4	0
Colestase	1	0
Degeneração Hidrópica	1	0
Infiltrado Inflamatório	3	0
Fibrose	2	0
Hiperplasia Ductal	3	0

0: ausentes, 1: presença mínima, 2: presença discreta, 3: presença moderada, 4: presença intensa

Das alterações hepatocelulares, a necrose foi o comprometimento mais regular e intenso no grupo FHA, embora fossem observados alguns nódulos remanescentes do parênquima hepático em alguns casos e, em outros não (figuras 8 e 9).

A colestase e a degeneração hidrópica foram alterações inconspícuas.

Observou-se infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos, alguns plasmócitos e raros eosinófilos (figura 10), principalmente em associação a alterações morfológicas caracterizadas como proliferação ductal (figura 11).

As colorações de tricrômico de Masson e de Picrossirius red demonstraram aumento da densidade de colágeno (figuras 12 e 13).

Ilustrações – Resultados Histologia: grupos falência hepática fulminante (FHA) e controle

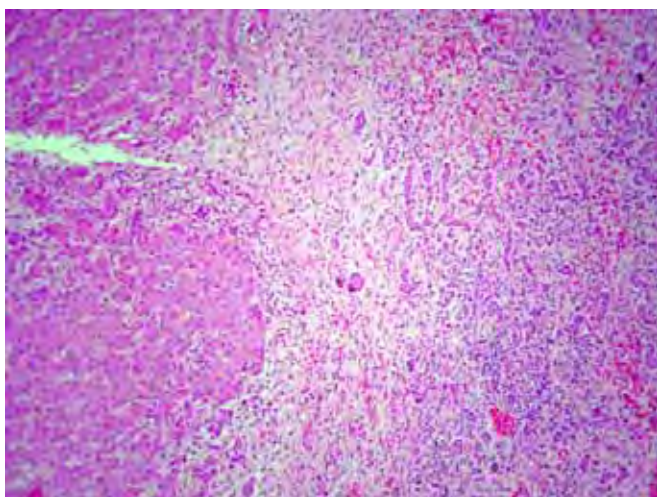


Figura 8 – *Fígado com FHA: Necrose hepática, área de hepatócitos remanescentes e infiltrado inflamatório (HE – 200X)*

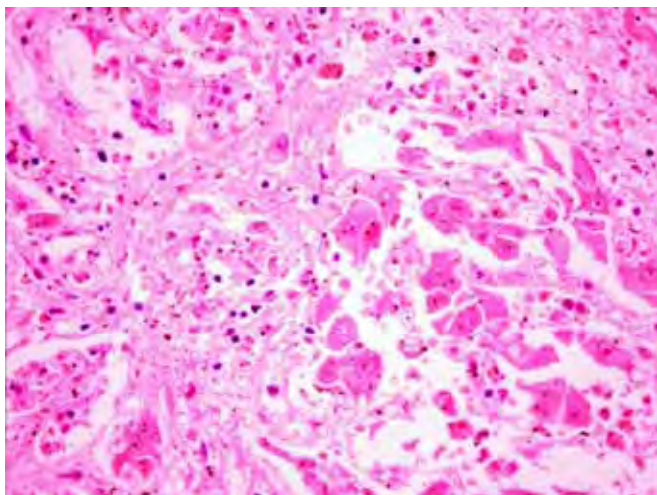


Figura 9 – *Fígado com FHA: Necrose hepática extensa com poucos hepatócitos preservados (HE -200X)*

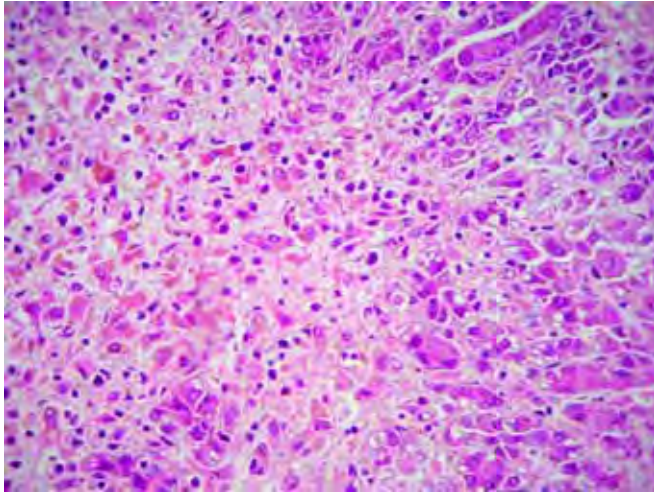


Figura 10 – *Fígado com FHA*: área de necrose com infiltrado inflamatório linfocítico-histioplasmocitário (HE -200X)

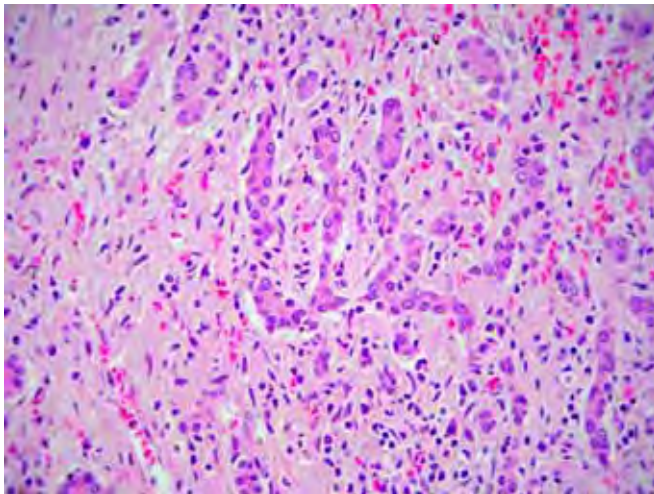


Figura 11 – *Fígado com FHA*: área de proliferação ductal em continuidade com área de necrose hepatocelular e infiltrado inflamatório (HE -200X)

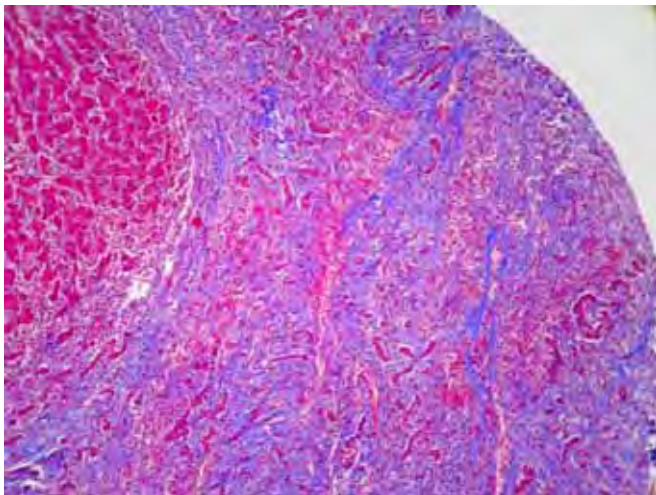


Figura 12 – *Fígado com FHA*: área de necrose hepática com fibrose e proliferação ductal ao lado de área de hepatócitos remanescentes (MASSON – 200X)

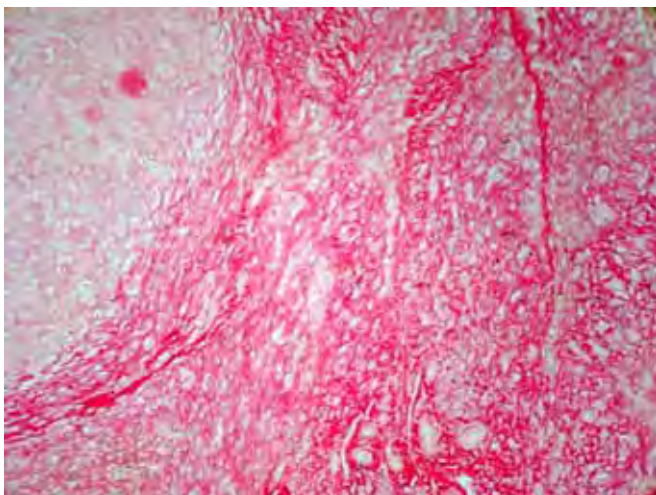


Figura 13 – *Fígado com FHA*: Mesma área da figura anterior (PICROSSIRIUS RED - 200X)

Resultados

AVALIAÇÃO DESCRITIVA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise de proliferação celular obtida pela expressão do anticorpo Ki67 encontra-se no quadro 2, onde 1+: até 33% de proliferação celular, 2+: 33%- 66% e 3+: 66%- 100%. Houve imunomarcacão de vários tipos celulares (figuras 14 e 15) inviabilizando a análise quantitativa de proliferação hepatocelular.

A imunomarcacão pelo anticorpo HepPar1 salientou a presença de poucos hepatócitos em meio à extensa necrose do parênquima hepático no grupo FHA (figura 17) quando comparada ao grupo controle (figura 16).

A distribuição das células de Kupffer que é regular no fígado normal (figura 18) apresentou-se como um dos componentes do infiltrado inflamatório que substituiu a área de necrose no grupo FHA (figura 19). A imunomarcacão com CD68 possibilitou distingui-la de outras células inflamatórias; no grupo FHA houve significativo aumento de sua densidade morfométrica.

CK7 e CK19 são marcadores do epitélio ductal e, portanto identificam os ductos biliares portais em fígados normais (figuras 20 e 22). No grupo de FHA houve significativo aumento de estruturas ductais/ductulares (figuras 21 e 23).

A imunomarcacão com 1A4 demonstrou positividade nas paredes vasculares dos espaços porta e em algumas células sinusoidais no grupo controle (figura 24). No grupo FHA houve aumento significativo de estruturas imunomarcadas, especialmente no compartimento intralobular (figura 25).

CD34 é um imunomarcador de células endoteliais dos vasos portais e venulares em fígado normal (figura 26). No grupo FHA, visualmente, houve aumento da área marcada, não só dos vasos portais como também de estruturas intra-lobulares, periportais (figura 27).

Quadro2: Análise imuno-histoquímica semi-quantitativa da expressão do anticorpo Ki67 para os grupos falência hepática aguda (FHA) e controle.

IMUNOMARCAÇÃO COM KI67	
FHA UNESP	CONTROLE
1+	1+
1+	1+
1+	1+
1+	1+
1+	1+
3+	1+
1+	1+
1+	1+
1+	1+
1+	1+
2+	
3+	
1+	
2+	
1+	
3+	
3+	
1+	
2+	
1+	

1+: até 33%; 2+: 33% - 66%; 3+: 66% - 100%

Ilustrações – Resultados Imuno-histoquímica: grupos falência hepática fulminante (FHA) e controle

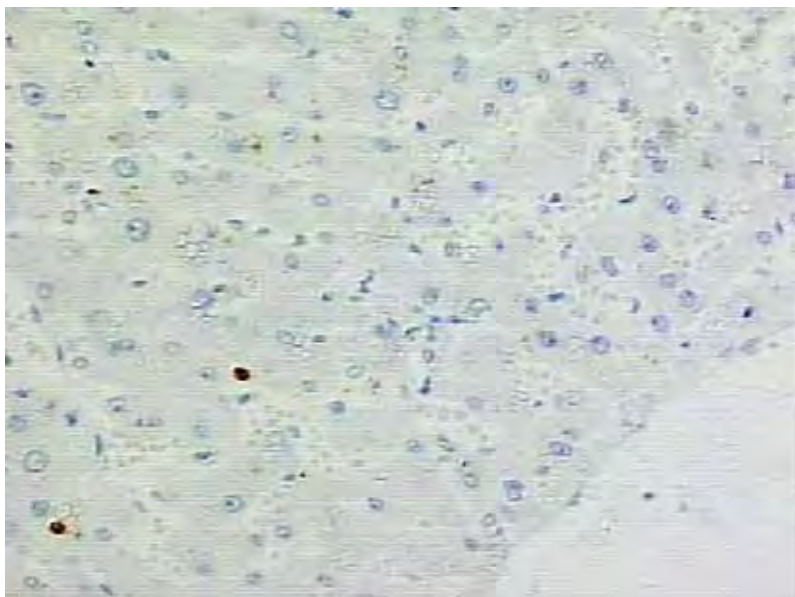


Figura 14 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo Ki67 (MIB1) para raras células em proliferação (200X)

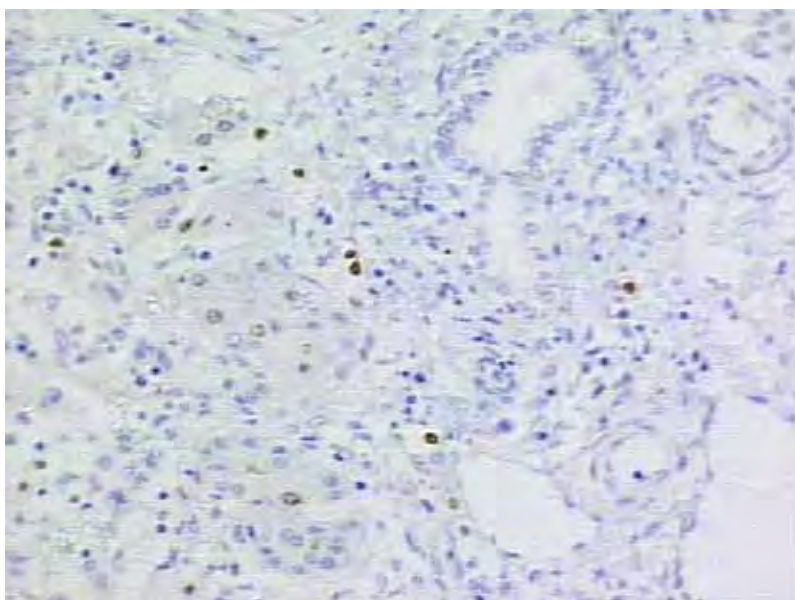


Figura 15 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo Ki67 (MIB1) para maior número de células em proliferação (200X)

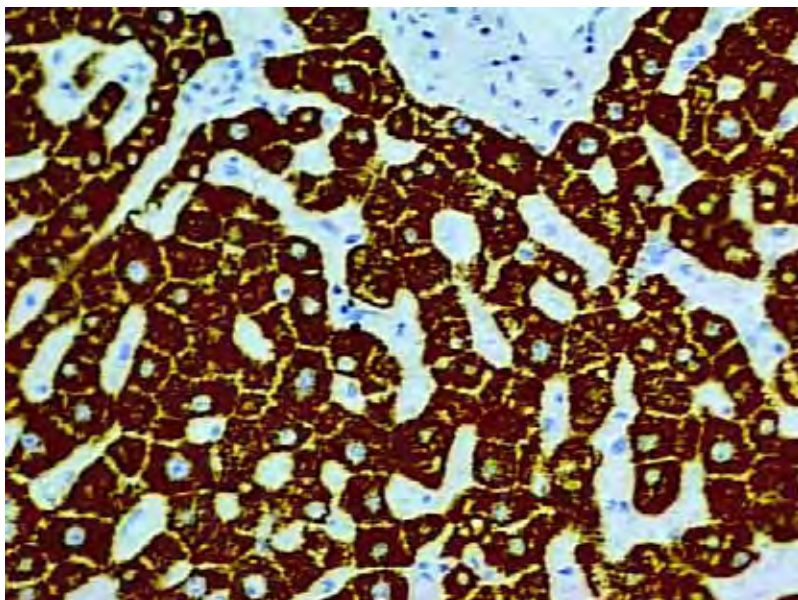


Figura 16 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo HepPar1 (200X)

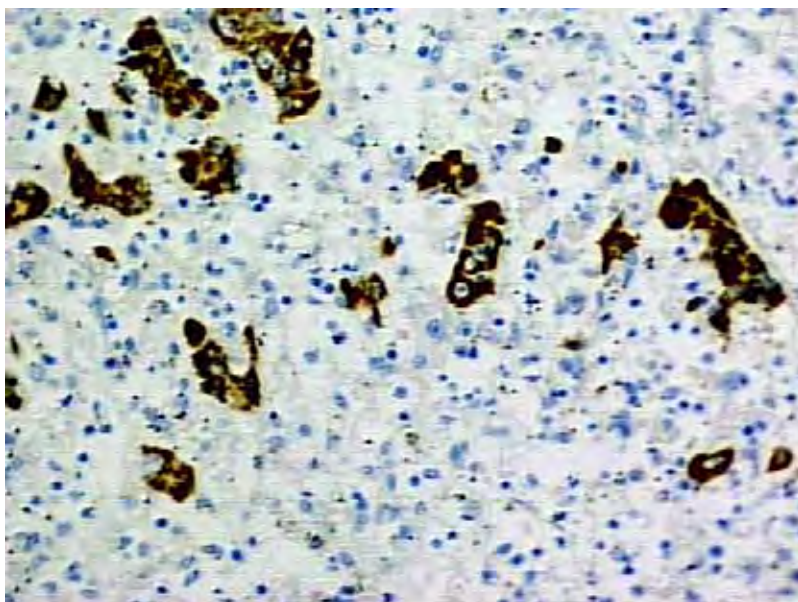


Figura 17 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo HepPar1 demonstrando presença de poucos hepatócitos em meio à área de necrose (200X)

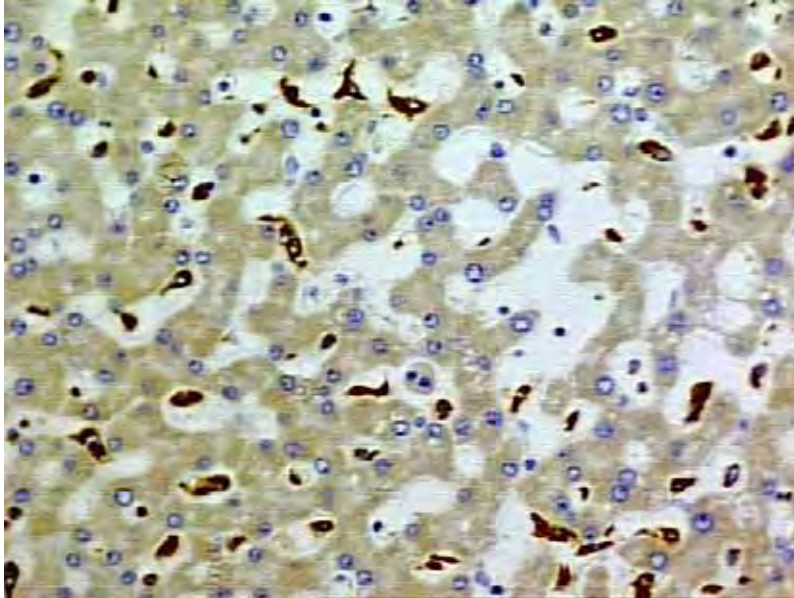


Figura 18 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CD68, demonstrando distribuição regular e quantidade normal de células de Kupffer ao longo dos sinusóides (200X)

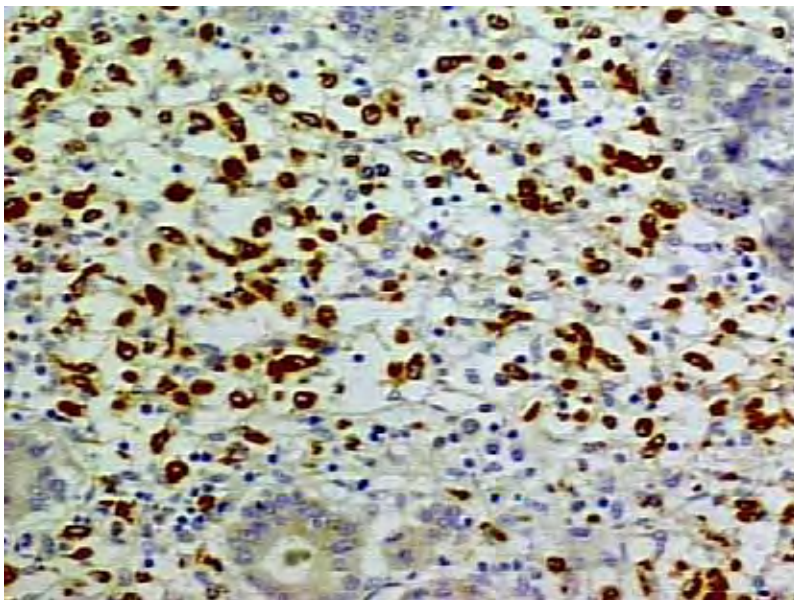


Figura 19 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CD68 demonstrando distribuição desordenada e aumento da quantidade de células de Kupffer (200X)

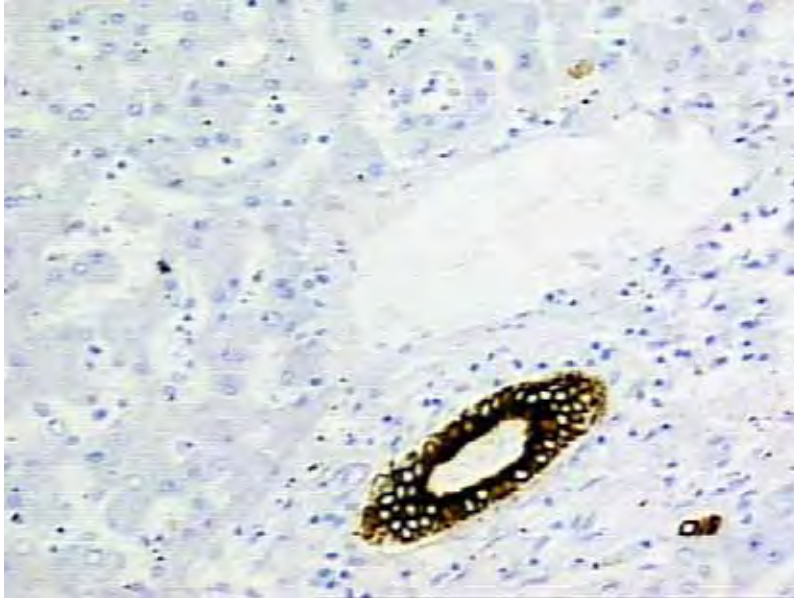


Figura 20 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CK7 para células ductais presentes no espaço porta (200X)

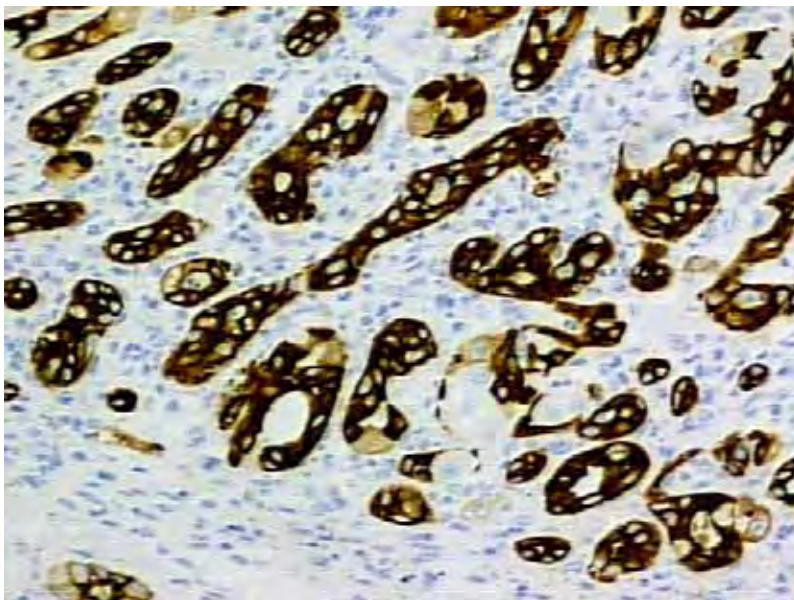


Figura 21 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CK7 evidenciando grande quantidade de células epiteliais ductais em área de necrose (200X)

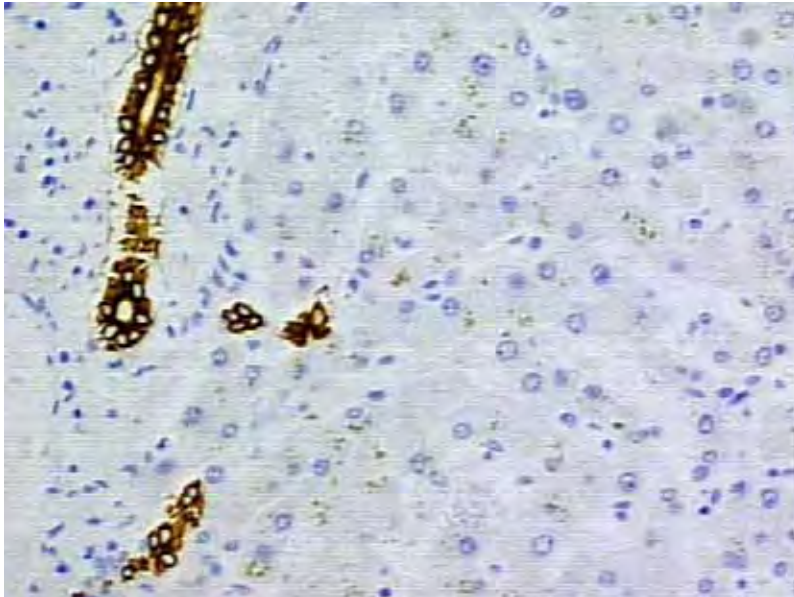


Figura 22 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CK19 para células ductais presentes no espaço porta (200X)

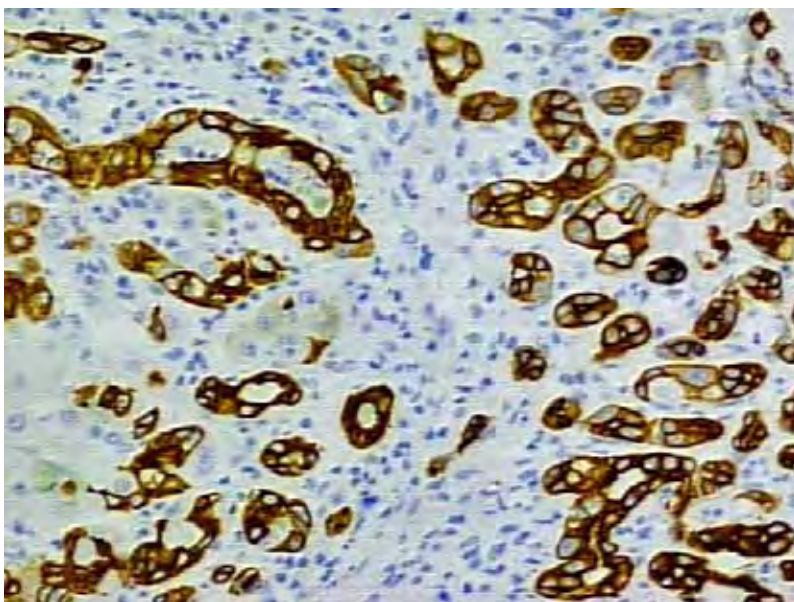


Figura 23 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CK19 evidenciando grande quantidade de células epiteliais ductais em área de necrose (200X)



Figura 24 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo 1A4 para células de músculo liso, com marcação de vasos do espaço porta e algumas células sinusoidais (200X)

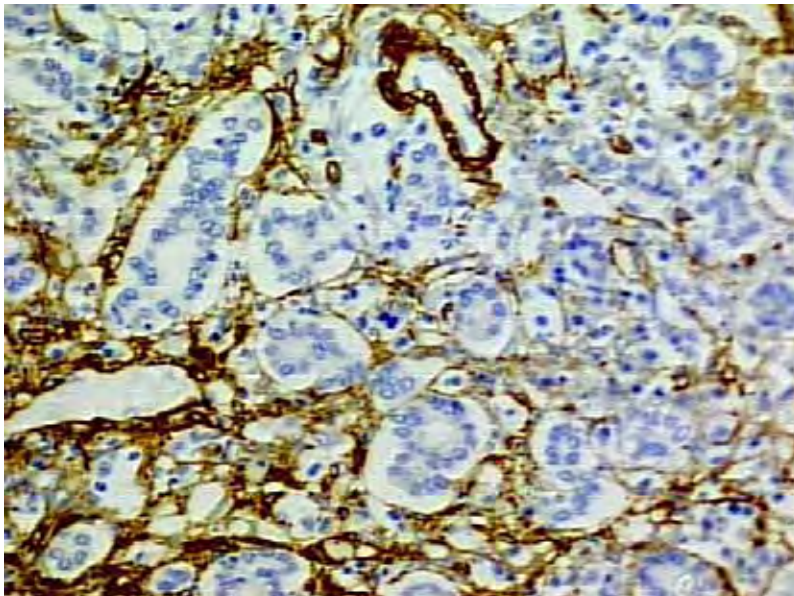


Figura 25 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo 1A4 para células de músculo liso e células hepáticas estreladas (200X)

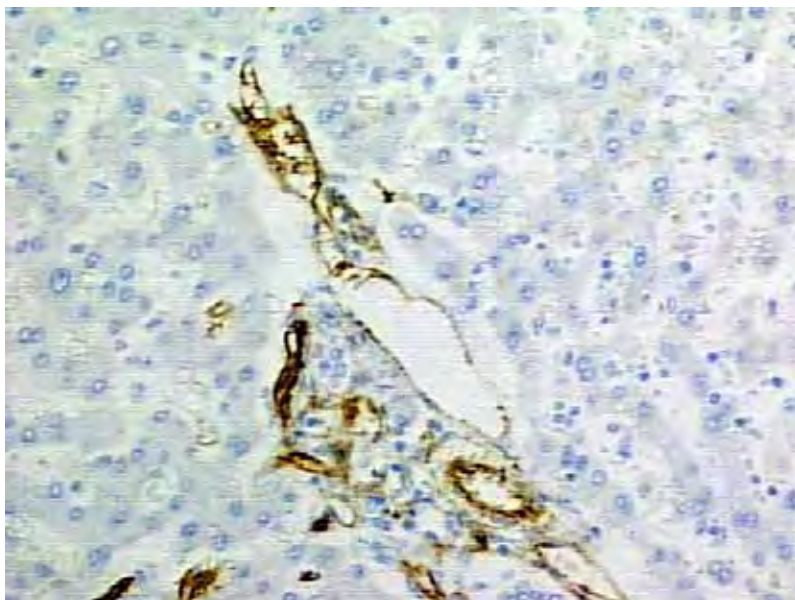


Figura 26 – *Fígado controle*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CD34 para células endoteliais presentes no espaço porta (200X)

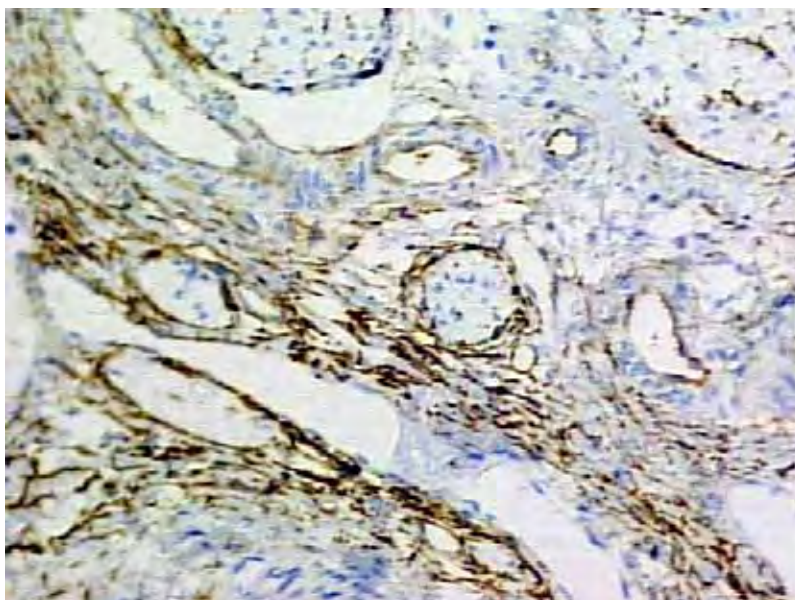


Figura 27 – *Fígado com FHA*: corte histológico imunomarcado com o anticorpo CD34 para células endoteliais e “células ovais”B, demonstrando aumento da área marcada em relação ao grupo controle (200X)

Resultados

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os resultados da análise estatística descritiva com as medidas de tendência central (média e mediana) e as medidas de dispersão (desvio padrão, coeficiente de variação, amplitude de variância, valores máximo e mínimo, 25° e 75° percentis e distância interquartil) das variáveis DMHepPar, DMCD68, DM1A4, DMCD34, DMCK7 e DMCK19 estão no quadro 3.

Os 19 casos do grupo FHA e os 10 casos do grupo controle quanto à DMCD34 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (Teste de Mann-Whitney: $T = 117,000$; $n(\text{menor}) = 10$ $n(\text{grande}) = 19$; p do erro $\alpha = 0,136$).

Nos 19 casos do grupo FHA e nos 10 casos do grupo controle de cada densidade morfométrica estudada houve diferença estatisticamente significativa nas variáveis abaixo:

1. DMHepPar – Teste de Mann-Whitney ($T = 245,000$; $n(\text{menor}) = 10$ $n(\text{grande}) = 19$; p do erro $\alpha \leq 0,001$).
2. DMCD68 – Teste de Mann-Whitney ($T = 66,000$; $n(\text{menor}) = 10$ $n(\text{grande}) = 19$; p do erro $\alpha \leq 0,001$).
3. DM1A4 – Teste t de Student ($t = 2,587$; graus de liberdade = 27; p do erro $\alpha = 0,015$).
4. DMCK7 – Teste de Mann-Whitney ($T = 58,000$; $n(\text{menor}) = 10$ $n(\text{grande}) = 19$; p do erro $\alpha \leq 0,001$).
5. DMCK19 – Teste de Mann-Whitney ($T = 55,000$; $n(\text{menor}) = 10$ $n(\text{grande}) = 19$; p do erro $\alpha \leq 0,001$).

Os gráficos obtidos na análise estatística inferencial para as variáveis estudadas dos grupos FHA e controle encontram-se nas figuras de 28 a 33.

Os resultados do teste de correlação linear múltipla entre DMCK7 (variável dependente), e as variáveis DMHepPar, DMCD68, DM1A4, DMCD34 e DMCK19 (variáveis independentes) para o grupo de FHA foram ajustadas à seguinte equação:

$$\text{DMCK7} = [-3426.815 + (0.00849 * \text{DMHepPar}) + (1.128 * \text{DMCK19}) - (0.571 * \text{DMCD34}) + (0.562 * \text{DM1A4}) + (0.00817 * \text{DMCD68})]$$

O valor do coeficiente de regressão linear múltipla (R) foi de 0,862, o do coeficiente de determinação (R^2), 0,743 e o do coeficiente de determinação ajustado, (Adj R^2) 0.644.

Nem todas as variáveis pareceram necessárias para a predição de DMCK7. As variáveis DMCK19 e DM1A4 parecem suficientes para explicar a capacidade de prever DMCK7. As variáveis DMHepPar, DMCD68 e DMCD34 não se mostraram necessárias na predição de DMCK7.

Os resultados do teste de correlação linear múltipla entre a densidade DMCK7 (variável dependente) e as variáveis DMHepPar, DMCD68, DM1A4, DMCD34 e DMCK19 (variáveis independentes) para o grupo controle foram ajustadas à seguinte equação:

$$\text{DMCK7} = [74.153 + (0.00401 * \text{DMHepPar}) + (1.477 * \text{DMCK19}) - (0.383 * \text{DMCD34}) + (0.0106 * \text{DM1A4}) - (0.0240 * \text{DMCD68})]$$

O valor do coeficiente de regressão linear múltipla (R) foi de 0.967, o do coeficiente de determinação (R^2), 0.934 e o do coeficiente de determinação ajustado, (Adj R^2) 0.852.

Nem todas as variáveis pareceram necessárias para a predição de DMCK7. A variável DMCK19 pareceu suficiente para explicar a capacidade de prever DMCK7. As variáveis DMHepPar, DMCD68, DM1A4 e DMCD34 não se mostraram necessárias na predição de DMCK7.

Quadro 3: Resultados da análise estatística descritiva para as variáveis das densidades morfológicas das lâminas imunomarcadas pelo anticorpo HepPar1 (DMHepPar), por CD68 (DMCD68), por CD34 (DMCD34), por IA4 (DM1A4), por CK7 (DMCK7) e por CK19 (DMCK19) para os grupos de falência hepática fulminante (FHA) e controle.

<i>VARIÁVEIS</i>	GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	CV	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIANA	25° PERC	75° PERC	DIQ
DMHepPar	FHA	19	6705,111	7972,488	118,9017	21716,128	19,704	2860,909	279,736	13991,715	13711,98
	CONT	10	45006,004	11368,230	25,25936	68608,670	29394,360	43216,163	38804,162	48903,323	10099,16
DMCD68	FHA	19	17966,273	11874,757	66,09462	43609,933	3236,903	12694,283	7289,967	29178,835	21888,87
	CONT	10	3605,065	2105,238	58,39667	7340,650	1610,293	2743,851	2210,461	5013,717	2803,256
DMCD34	FHA	19	1060,072	826,065	77,92537	2973,861	150,775	893,688	409,075	1707,616	1298,541
	CONT	10	529,005	279,185	52,77549	1051,535	248,450	503,950	274,802	660,147	385,345
DM1A4	FHA	19	6062,719	3267,590	53,89644	12073,647	2041,140	5176,750	3377,724	8748,600	5370,876
	CONT	10	3139,728	1932,608	61,55336	6909,398	949,695	2228,246	1990,727	3708,147	1717,42
DMCK7	FHA	19	6918,106	5486,745	79,30993	21629,105	505,655	5547,864	2573,533	11535,969	8962,436
	CONT	10	377,951	192,123	50,83278	614,688	75,351	437,155	225,156	511,259	286,103
DMCK19	FHA	19	6505,646	3908,373	60,07663	13083,515	579,466	6177,062	3374,020	9354,243	5980,223
	CONT	10	6487,836	4578,003	70,56287	13083,515	579,466	6164,226	2943,336	11348,385	8405,049

N: Número de casos; CV: coeficiente de variação, DIQ: distância interquartil, 25° PERC: 25° percentil, 75° PERC: 75° percentil.

Gráficos – Resultados Análise estatística: grupos falência hepática fulminante (FHA) e controle

Figura 28: Densidade Morfométrica das células marcadas com anticorpo HepPar1 (DMHepPar) – Gráfico do tipo *Box plot* representando a densidade morfométrica das células marcadas (hepatócitos) com anticorpo HepPar, analisadas em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No *Box plot*, o limite superior do retângulo representa o 75º percentil e o limite inferior o 25º percentil. O traço horizontal indica a mediana de cada grupo e as barras de erro os 10º e 90º percentis. Os pontos representam os valores abaixo do 10º percentil e acima do 90º percentil.

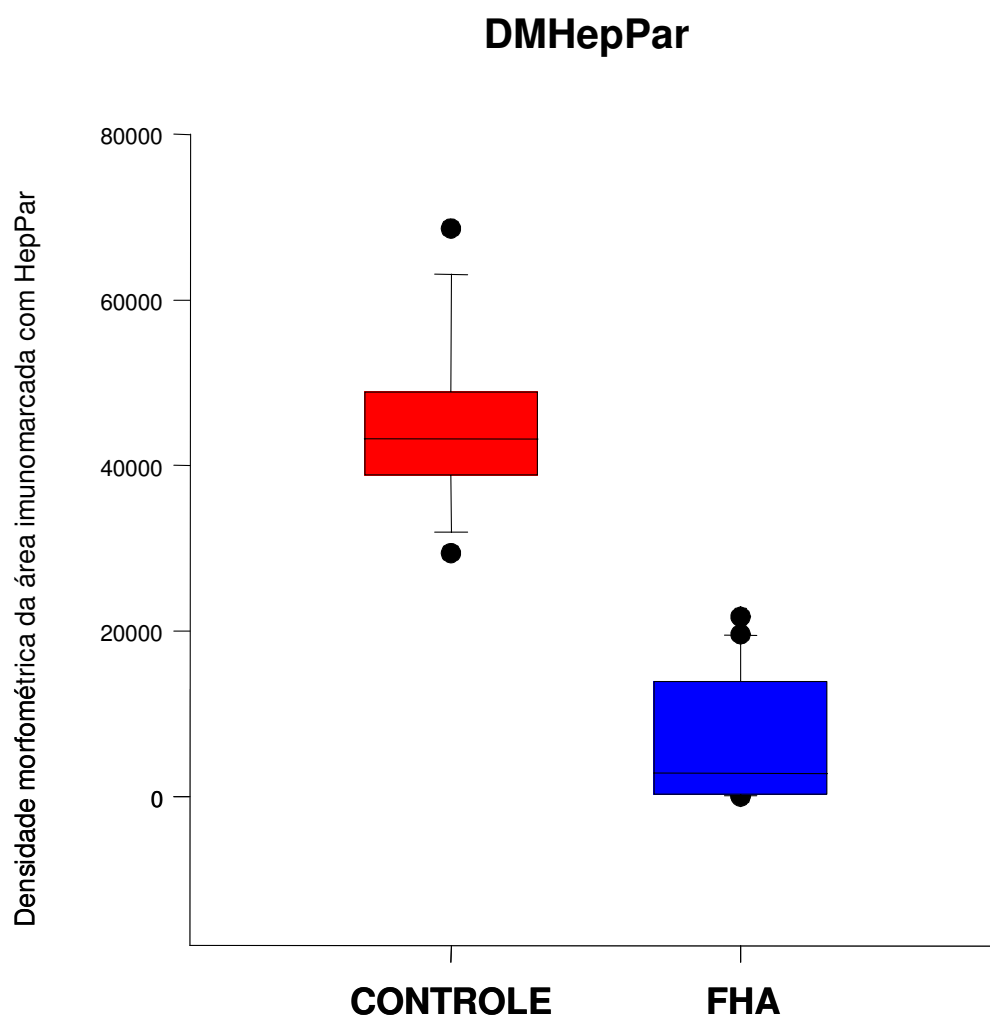


Figura 29: Densidade Morfométrica das células marcadas com CD68 (DMCD68) – Gráfico do tipo *Box plot* representando a densidade morfométrica das células marcadas (células de Kupffer) com CD68, analisadas em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No *Box plot*, o limite superior do retângulo representa o 75º percentil e o limite inferior o 25º percentil. O traço horizontal indica a mediana de cada grupo e as barras de erro os 10º e 90º percentis. Os pontos representam os valores abaixo do 10º percentil e acima do 90º percentil.

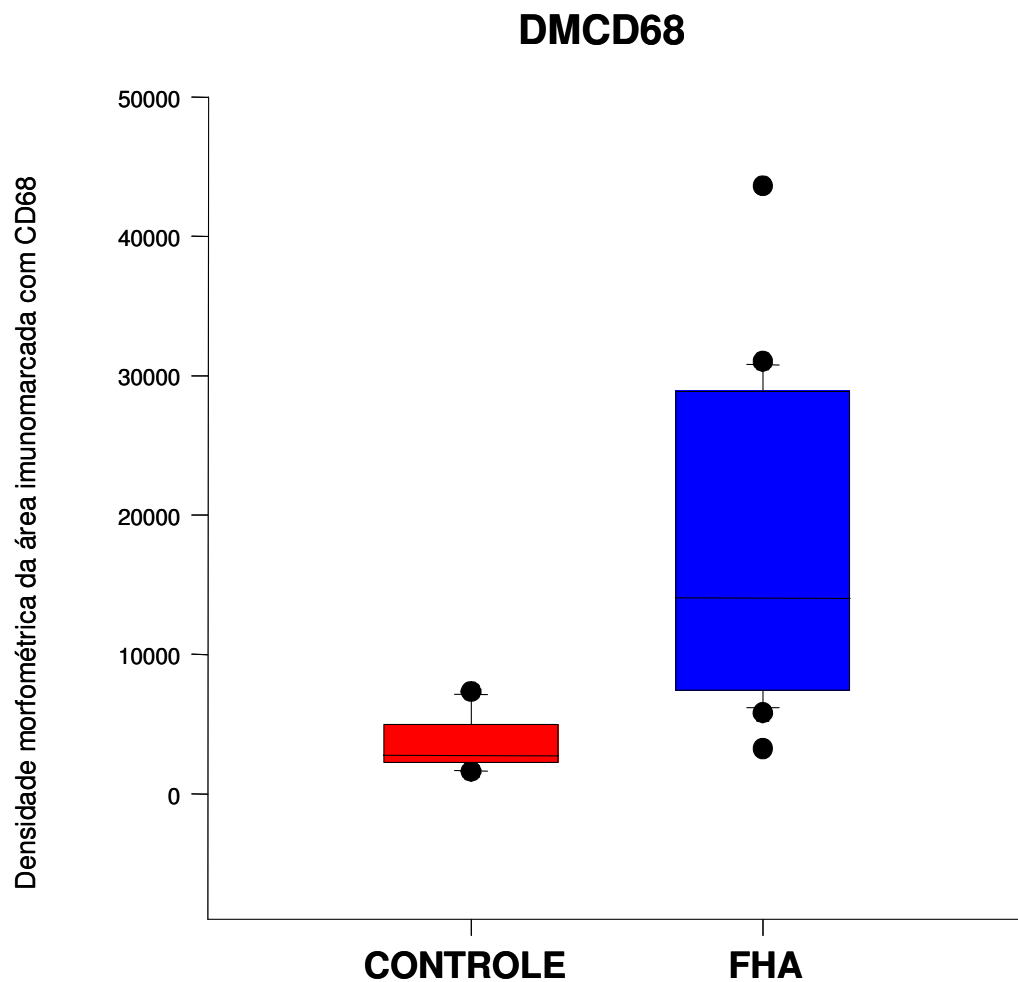


Figura 30: Densidade Morfométrica das células marcadas com CD34 (DMCD34) – Gráfico do tipo *Box plot* representando a densidade morfométrica das células marcadas com CD34, analisadas em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No *Box plot*, o limite superior do retângulo representa o 75º percentil e o limite inferior o 25º percentil. O traço horizontal indica a mediana de cada grupo e as barras de erro os 10º e 90º percentis. Os pontos representam os valores abaixo do 10º percentil e acima do 90º percentil.

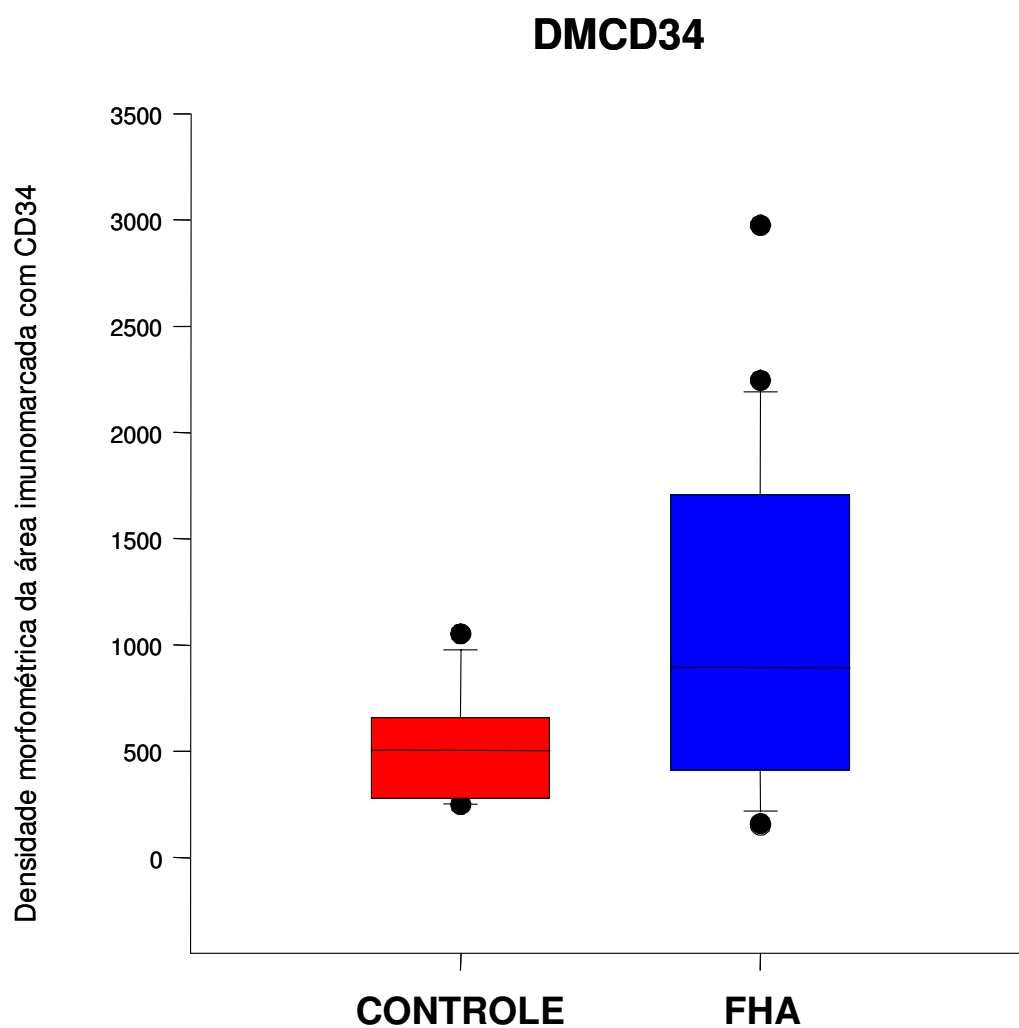


Figura 31: Densidade Morfométrica das células marcadas com 1A4 (DM1A4) – Gráfico do tipo “*Point column and means*” representando a densidade morfométrica das células marcadas com 1A4, analisada em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No “*Point column and means*” o ponto central representa a média, as barras de erro representam um desvio padrão acima abaixo da média. Ao lado estão os pontos representando a média das 20 medidas de cada caso estudado.

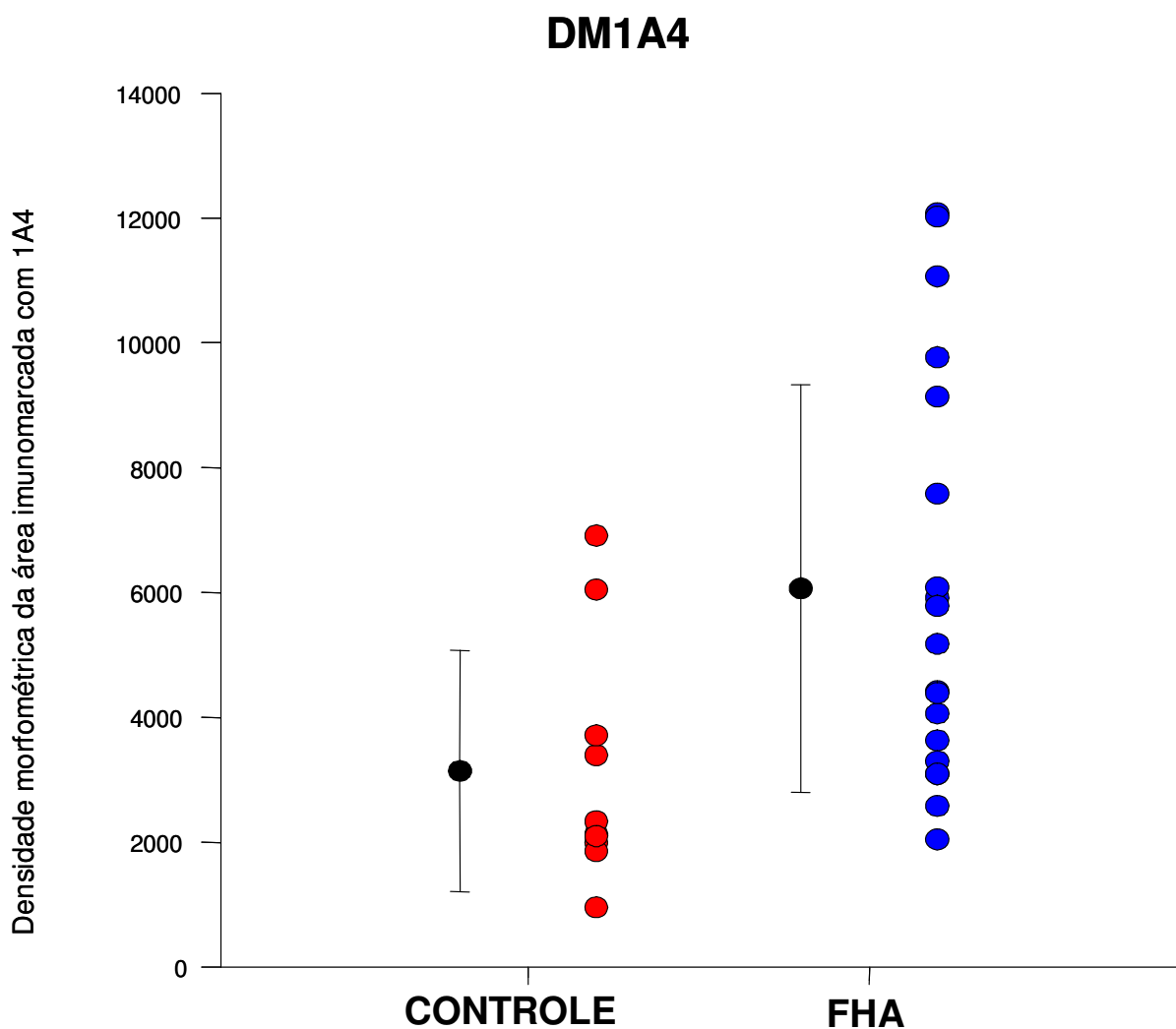


Figura 32: Densidade Morfométrica das células marcadas com CK7 (DMCK7) – Gráfico do tipo *Box plot* representando a densidade morfométrica das células marcadas com CK7, analisadas em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No *Box plot*, o limite superior do retângulo representa o 75º percentil e o limite inferior o 25º percentil. O traço horizontal indica a mediana de cada grupo e as barras de erro os 10º e 90º percentis. Os pontos representam os valores abaixo do 10º percentil e acima do 90º percentil.

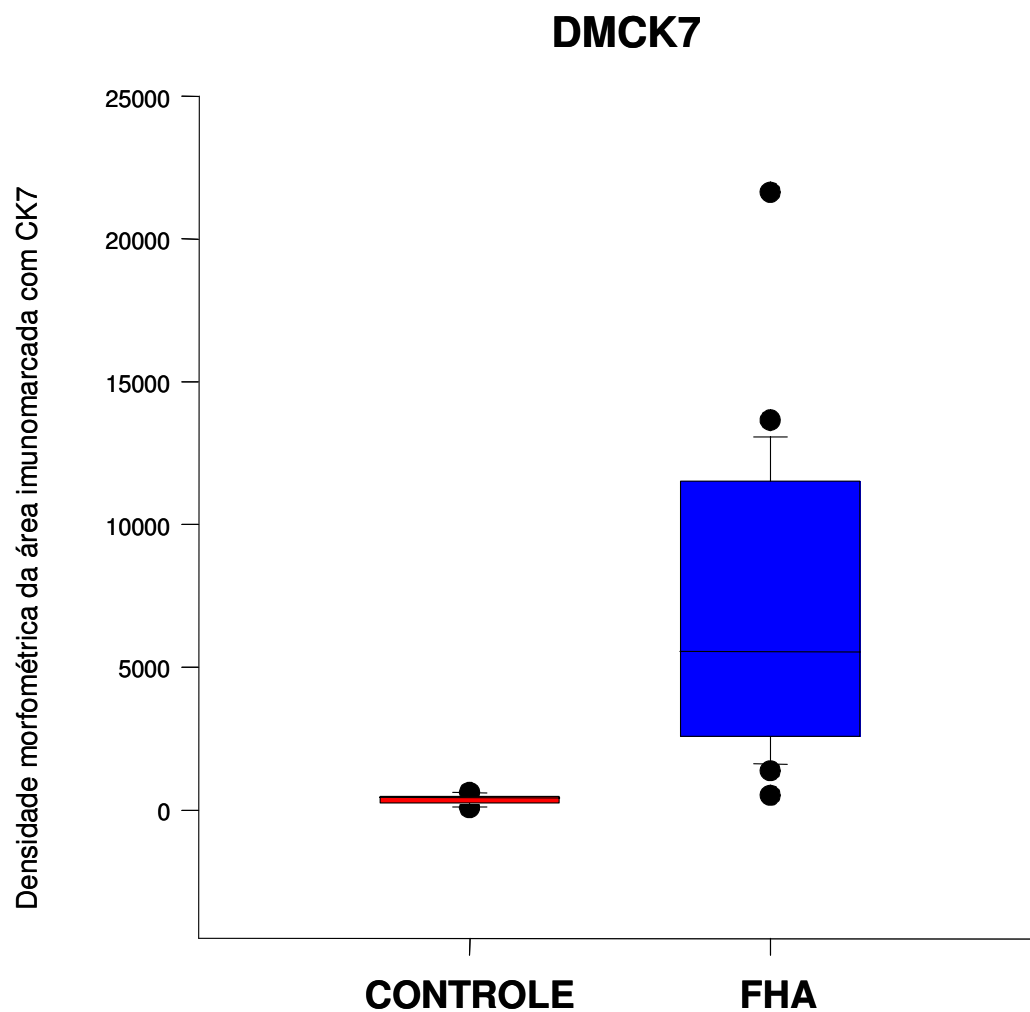
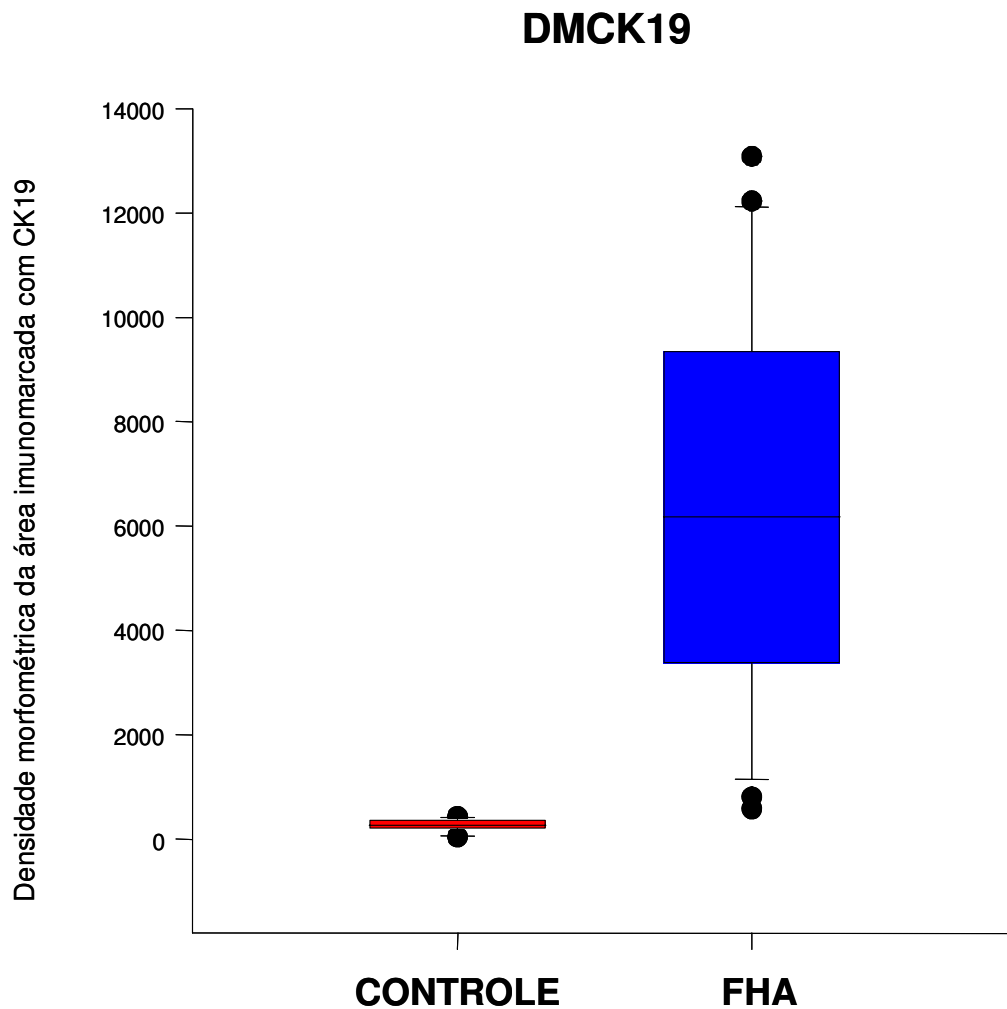


Figura 33: Densidade Morfométrica das células marcadas com CK19 (DMCK19) – Gráfico do tipo *Box plot* representando a densidade morfométrica das células marcadas com CK19, analisadas em 20 campos de 19 casos do grupo falência hepática aguda (FHA) e 10 casos do grupo controle estudados. No *Box plot*, o limite superior do retângulo representa o 75º percentil e o limite inferior o 25º percentil. O traço horizontal indica a mediana de cada grupo e as barras de erro os 10º e 90º percentis. Os pontos representam os valores abaixo do 10º percentil e acima do 90º percentil.



Discussão

Falência hepática aguda é uma alteração rara, mas que representa uma das emergências mais desafiadoras encontradas na prática clínica (SASS & SHAKIL, 2005).

O alto risco de mortalidade e os resultados pouco promissores aos esquemas terapêuticos existentes para FHA conduziram este trabalho a fim de estudar os componentes celulares que participam do processo de regeneração hepática.

A regeneração hepática é um processo que depende de células com capacidade proliferativa (hepatócitos e células progenitoras) e de células que atuam produzindo substâncias capazes de promover a proliferação (células de Kupffer e células hepáticas estreladas) (SELL, 2001; FAUSTO, 2005; ZHENG & TANIGUCHI, 2003; JAKUBOWSKI et al, 2005; FAUSTO et al, 2006; KHAN & MUDAN, 2008; RUTHERFORD & CHUNG, 2008). Assim, foram realizadas imunomarcações a fim de demonstrar a presença e quantidade dessas células nos casos de FHA comparadas ao grupo controle.

A revisão histopatológica dos casos de FHA incluídos no estudo demonstrou necrose do tecido hepático, com similaridade no número de casos de necrose submaciça e maciça, havendo perda de hepatócitos e substituição por áreas infiltradas por células inflamatórias mononucleares, principalmente histiócitos, linfócitos e plasmócitos. Ocorreu também presença de proliferação variável de ductos biliares e de fibrose moderada detectada nas colorações pelas técnicas de tricrômico de Masson e de Picrosirius red.

Os achados histopatológicos encontrados estão de acordo com o visto em literatura (CRAWFORD, 2000; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; GARTNER & HIATT, 2001; GILL & STERLING, 2001), à exceção dos componentes do infiltrado inflamatório que em nosso estudo demonstrou presença significativa de linfócitos, além de alguns plasmócitos e raros eosinófilos.

HepPar1 é um excelente marcador de hepatócitos e demonstrou, no grupo dos fígados controle, densidade morfométrica semelhante a descrição de literatura que

cita que os hepatócitos maduros de fígados normais correspondem à cerca de 90% da massa hepática (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; GARTNER & HIATT, 2001). Houve diminuição significativa dos hepatócitos nos casos de FHA, conforme citado em literatura, uma vez que ocorrem extensas áreas de necrose nessa patologia (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000), o que justifica a ativação das células progenitoras no processo de regeneração do grupo FHA, conforme foi visto nos resultados.

A imunomarcagem das células de Kupffer com CD68 demonstrou distribuição sinusoidal regular nos casos controle e esteve presente como componente do infiltrado inflamatório nos casos de FHA. Houve maior densidade morfométrica nos casos de FHA quando comparados ao grupo controle. Esses achados estão de acordo com a literatura, conforme citado abaixo.

As células de Kupffer são os macrófagos residentes do fígado, originadas em parte pelo recrutamento de monócitos circulantes e em parte da proliferação da população endógena de macrófagos (WINWOOD & ARTHUR, 1993; MALIK, SELDEN, HODGSON, 2002). Nos fígados normais permanecem no lúmen dos sinusóides, sob ou entre as células endoteliais mantendo contato direto com as células hepáticas estreladas e hepatócitos e sendo mais numerosas perto dos espaços-porta (WINWOOD & ARTHUR, 1993; SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000). As células de Kupffer modulam a resposta imune e inflamatória por meio da secreção de citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral, além de possuírem capacidade de fagocitose, apresentação de antígenos e de combate aos radicais livres (WINWOOD & ARTHUR, 1993; MALIK, SELDEN, HODGSON, 2002).

A imunomarcagem pelo anticorpo CD34 no grupo controle demonstrou uma densidade capilar de distribuição homogênea principalmente em regiões dos espaços porta e vênulas centrais. As células endoteliais sinusoidais diferem das células endoteliais capilares em seu imunofenótipo e são normalmente negativas para CD31

e CD34, que são marcadores de células endoteliais capilares (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000).

No grupo de FHA houve maior densidade morfológica de CD34 em relação ao grupo controle; no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. O CD34 é citado em trabalhos de ALISON et al (2001) e CROSBY et al (2001) como capaz de identificar células progenitoras do fígado humano adulto normal e patológico. No nosso trabalho essa imunomarcagem não foi claramente demonstrada, podendo estar de acordo com trabalho de SUSKIND & MUENCH (2004) que demonstra que o CD34 não é um marcador de células ovais mas, parece marcar células hepáticas estreladas.

O 1A4 é um marcador de músculo liso e também descrito como marcador de células estreladas ativadas que se comportam como células miofibroblásticas. (SCHEUER & LEFKOWITCH, 2000; DABEVA & SHAFRITZ, 2003). No grupo controle, o anticorpo 1A4 marcou músculo liso dos vasos dos espaços porta e algumas células sinusoidais, provavelmente células hepáticas estreladas. No grupo FHA houve aumento significativo da densidade morfológica das células imunomarcadas com 1A4, especialmente no compartimento intralobular onde podemos inferir que se tratam de células hepáticas estreladas ativadas.

A marcação por CK7 e CK19 nos casos de FHA demonstrou maior densidade de estruturas ductais/ductulares em relação aos casos do grupo controle com diferença estatística significativa.

A maior densidade ductal/ductular nos casos de FHA pode ser relativa pela destruição dos hepatócitos (O'GRADY et al, 1993; BURKITT et al, 1994), mas pode-se também inferir que existe maior densidade absoluta por proliferação de células ovais, uma vez que elas apresentam características de imunomarcagem semelhantes às células epiteliais biliares (ALISON, 2002; FAUSTO & CAMPBELL, 2003; ZHENG & TANIGUCHI; 2003).

Essa reação ductal/ductular é aceita como sendo uma resposta das células progenitoras e não uma metaplasia dos hepatócitos que sofreram injúria (VOGLER

et al, 2000; ALISON et al, 2001; TAN et al, 2002); isso porque esses d ctulos at picos compartilham muitas características com as células ovais, como sua presença associada   falência hepática aguda, o fato de ambas as re  es se iniciarem na região periportal e estarem conectadas aos canais de Hering, e ambas as células carregarem receptores para os mesmos fatores de crescimento e estando sempre acompanhadas de perto pelas células hepáticas estreladas (WRIGHT, 2002).

O teste de regressão linear múltiplo mostrou que por meio da imunomarca o com 1A4   possível prever o resultado do CK7, ou seja, que há dependência de uma variável em rela o   outra.

Em literatura,   citado que nos casos de doenças com evolu o para fibrose a célula hepática estrelada   ativada precedendo o processo fibrótico (GEERTS, 2001). Em casos de doença hepática colestática experimental, produzida pela obstru o de ductos biliares, ocorre hiperplasia ductal/ductular que desaparece quando   realizada a descompressão biliar. Nesse mesmo momento ocorre também, o desaparecimento de miofibroblastos. Esses eventos celulares sugerem que ocorre aumento na síntese de matriz que permite que ocorra reparo tecidual (RAM et al, 2000; VOGLER et al, 2000). Pelo nosso trabalho   possível inferir que o mesmo processo ocorre na doença hepática aguda fulminante.

A utiliza o do Ki67 para detec o de prolifera o celular demonstrou positividade para vários tipos de células inflam t rias, além de hepatócitos e células ductais. Assim, não foi possível a individualiza o das popula es celulares específicas, o que inviabilizou a quantifica o da atividade proliferativa dos hepatócitos, que era um dos nossos objetivos na avalia o da regenera o hepática.

Conclusões

- ✓ Na FHA houve significativa perda de massa hepatocelular, com ou sem nódulos de parênquima remanescente, independente da evolução para o óbito ou para o transplante;
- ✓ Simultaneamente houve proliferação de células que se dispõem na forma de ductos/dúctulos biliares que foram parcialmente avaliados como células ovais devido ao seu imunofenótipo;
- ✓ Houve acúmulo de células de Kupffer nas áreas de perda da massa hepatocelular indicando o seu papel na fagocitose;
- ✓ Houve proximidade entre proliferação ductal/ductular e área de maior acúmulo de células inflamatórias, incluindo células de Kupffer, linfócitos, alguns plasmócitos e raros eosinófilos;
- ✓ Houve relação de dependência entre as variáveis 1A4 e CK7, achado que reforça a importância do aumento de fibrose nas áreas de proliferação ductal/ductular observado às colorações de tricrômico de Masson e Picrosirius red;
- ✓ A imunomarcagem para proliferação celular demonstrou aumento de sua densidade no grupo FHA, porém, não foi possível separar os hepatócitos de outros tipos celulares em proliferação.

Referências bibliográficas

1. ALISON, M. Liver regeneration with reference to stem cells. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 385-387.
2. ALISON, M.; POULSOM R.; FORBES, S. T. Update on hepatic stem cells. **Liver**. 2001; 21: 367-373.
3. ANDRADE, R.; LUCENA, M. I.; FERNADEZ, M. C.; GONZALEZ, M. Fatal Hepatitis Associated with Nimesulide. **Journal of Hepatology**. 2000; 32 (1): 174.
4. BERNAL, W.; WENDON, J. Acute Liver Failure. **Current Opinion in Anaesthesiology**. 2000; 13 (2): 113-118.
5. BURKITT, H. G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Wheater – Histologia funcional**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994: 271-278.
6. BURT, A. D.; PATH, M. R. C.; LE BAIL, B.; BALABAUD, C.; BIOULAC-SAGE, P. Morphologic Investigation of Sinusoidal Cells. **Seminars in Liver Disease**. 1993; 13 (1): 21-35.
7. CRAWFORD, J. M. O fígado e o trato biliar. In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; 759-808.
8. CROSBY, H. A; KELLY, D. A.; STRAIN, A. J. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. **Gastroenterology**. 2001; 120: 534-544.

9. DABEVA, M. D.; SHAFRITZ, D. A. Hepatic Stem Cells and Liver Repopulation. **Seminars in Liver disease**. 2003; 23 (4): 349-362.
10. DURAND, P.; DEBRAY, D.; MANDEL, R.; BAUJARD, C.; BRANCHEREAU, S.; GAUTHIER, F.; JACQUEMIN, E.; DEVICTOR, D. Acute Liver Failure in Infancy: A 14-year Experience of a Pediatric Liver Transplantation Center. **The Journal of Pediatrics**. 2001; 139 (6): 871-876.
11. FAUSTO, N. Tweaking liver progenitor cells. **Nature Medicine**. 2005; 11(10): 1053-1054.
12. FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mechanisms of Development**. 2003; 120:117-130.
13. FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**. 2006; 43: S45-S53.
14. FONTANA, R. J. Acute liver failure including acetaminophen overdose. **Medical Clinics of North America**. 2008; 92 (4): 761-794.
15. GARTNER, L. P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001: 344-355.
16. GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease**. 2001; 21 (3): 311-328.

17. GILL, R. Q.; STERLING, R. K. Acute Liver Failure. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 2001; 33 (3): 191-198.
18. GOW, P. J.; JONES, R. M.; DOBSON, J. L.; ANGUS, P. W. Etiology and Outcome of Fulminant Hepatic Failure managed at an Australian Liver Transplant Unit. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2004; 19 (2): 154-159.
19. JAKUBOWSKI, A.; AMBROSE, C.; PARR, M.; LINCECUM, J. M.; WANG, M. Z.; ZHENG, T. S.; BROWNING, B.; MICHAELSON, J. S.; BAESTCHER, M.; WANG, B.; BISSELL, D. M.; BURKLY, L. C. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. **The Journal of Clinical Investigation**. 2005; 115 (9): 2330-2340.
20. KHAN, A.Z.; MUDAN, S. S. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. **AZN Journal of Surgery**. 2007; 77 (1-2): 9-14.
21. KAY, M. A.; FAUSTO, N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies. **Molecular Medicine Today**. 1997; 108-115.
22. KHAN, A.Z.; MUDAN, S. S. Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. **AZN Journal of Surgery**. 2007; 77 (1-2): 9-14.
23. KLATSKIN, G.; CONN, H. O. **Histopathology of the Liver- vol.1**. 1st.ed. Oxford: Oxford University Press, 1993: 459.
24. LEE, W. M. Acute Liver Failure in the United States. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (3): 217-226.

25. LEE, W. M. Medical Progress: Acute Liver Failure. **The New England Journal of Medicine**. 1993; 329 (25): 1862-1872.
26. LEE, W. M. Etiologies of acute liver failure. **Seminars in Liver Disease**. 2008; 28 (2):142-152.
27. MACSWEEN, R. N. M.; ISHAK, K. G.; ANTHONY, P. P.; SCHEUER, P. J.; BURT, A. D.; PORTMAN, B. C.; **Pathology of the liver**. Churchill Livingstone, 2002.
28. MALIK, R.; SELDEN, C.; HODGSON, H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. **Cell and Development Biology**. 2002; 13: 425-431.
29. MARTIN, J. L.; KEEGAN, M. T.; VASDEV, G. M. S.; NYBERG, S. L.; BOURDI, M.; POHL, L. R.; PLEVAK, D. J. Fatal Hepatitis Associated with Isoflurane Exposure and CYP2A6 Autoantibodies. **Anesthesiology**. 2001; 95 (2): 551-553.
30. MOHANTY, S. R.; LABRECQUE, D. R.; MITROS, F. A.; LAYDEN, T. J. Liver Transplantation for Disulfiram-induced Fulminant Hepatic Failure. **Journal of Gastroenterology**. 2004; 38 (3): 292-295.
31. O'GRADY, J. G.; PORTMANN, B.; WILLIAMS, R. Fulminant Hepatic Failure. In: SCHIFF, L., SCHIFF, E. R. **Diseases of the liver**. 7th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1993; 1077-1090.
32. OSTAPOWICZ, G.; LEE W. M. Acute hepatic failure: a Western perspective. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2000; 15:480-488.

33. RAM, G. A.; CARR, S. C.; BRIDLE, K. R.; LI, L.; BRITTON, R. S.; CRAWFORD, D. H. G. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. **Liver**. 2000; 20:387-396.
34. RUTHERFORD, A.; CHUNG, R. T. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration. **Seminars in Liver Disease**. 2008; 28 (2): 167-174.
35. SASS, D.; SHAKIL, A. O. Fulminant hepatic failure. **Liver Transplantation**. 2005; 11(6): 594-605.
36. SCHATNER, A.; SOKOLOVSKAYA, N.; COHEN, J. Fatal Hepatitis and Renal Failure During Treatment with Nimesulide. **Journal of Internal Medicine**. 2000; 247 (1): 153-155.
37. SCHEUER, P. J.; LEFKOWITCH, J. H. **Liver Biopsy Interpretation**. 6 ed.: W. B. Saunders, 2000; 369.
38. SELL, S.; Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. **Hepatology**. 2001; 33 930: 738-750.
39. SHAFRITZ, D. A.; DABEVA, M. D.; GROMPE, M. Liver Repopulation through Cell Transplantation. *In*: ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.; CHISARI, F. V.; SCHACHTER, D. **The Liver- Biology and Pathobiology**. 4ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 927-940.
40. SUSKIND, D. L.; MUENCH, M. O. Searching for common stem cells of the hepatic and hematopoietic systems in the human fetal liver: CD34+ cytokeratin

- 7/8+ cells express markers for stellate cells. **Journal of Hepatology**. 2004; 40:261-268.
41. 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**. 2002; 22: 365-373.
42. TREEM, W. R. Fulminant Hepatic Failure in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology Nutritional**. 2002; 35 (supp. 1): S33-S38.
43. VOGLER, C. A.; BACON, B. R.; TRACY, T. F. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. **Liver**. 2000; 20 (5): 387-396.
44. WILLIAMS, R. Classification, Etiology, and Considerations of Outcome in Acute Liver Failure. **Seminars in Liver Disease**. 1996; 16 (4): 343-348.
45. WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J.P. Kupffer cells: Their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. **Seminars in Liver Disease**. 1993; 13 (1): 50-56.
46. WRIGHT, C. N. Stem cell in tissue engineering and transplantation. **Histopathology**. 2002; 41(suppl.2): 222-226.
47. ZHENG, Y.; TANIGUCHI, H. Diversity of Hepatic Stem Cells in the Fetal and Adult Liver. **Seminars in Liver Disease**. 2003; 23 (4): 337-348.