

Karina Maxeniuc Silva

Papel da bradicinina
na fibrogênese hepática

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para a obtenção do título de Mestre
em Ciências

São Paulo
2009

Karina Maxeniuc Silva

Papel da bradicinina
na fibrogênese hepática

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientadora: Profa Dra Márcia Regina Nagaoka

Co-orientador: Prof Dr Durval Rosa Borges

São Paulo
2009

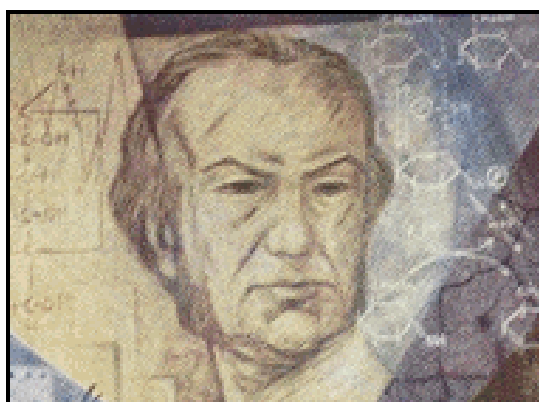
Maxeniuc-Silva, K

Papel da bradicinina na fibrogênese hepática/Karina Maxeniuc Silva – São Paulo, 2009, 80f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia

Título em inglês: Role of kinin receptor in liver fibrogenesis

1. Cininas. 2. Fígado. 3. Fibrose 4. *Knockout*. 5. Receptor B₁ de cininas



Dissertação elaborada no Laboratório de Hepatologia Experimental da Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia e apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

FAPESP (02/05260-6; 06/58533-0 e 08/55928-0)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por todos os momentos que passei durante esses dois anos, por estar comigo durante toda essa jornada, por ter me dado além de saúde, capacitação e vontade para prosseguir.

Agradeço a Profa. Dra. Márcia Regina Nagaoka e ao Prof. Dr. Durval Rosa Borges pela oportunidade de realizar essa tese e a professora pela sua orientação. Seu interesse, comprometimento e dedicação com a pesquisa e ensino são inspiradores e dignos de serem seguidos.

Agradeço a minha família. Muito obrigada mãe, pai, irmã, cunhado, namorado, avós, tios e tias por investirem por tanto tempo em minha vida. Obrigada pela paciência, por seus conselhos tão oportunos e por serem diretrizes em momentos decisivos.

Agradeço aos amigos que fiz no Leal Prado, muito obrigada Hercília Maris pelas inúmeras vezes que ia pedir algo; Loreane, por ter me ensinado “como revelar”, Débora e Leo pelas ajudas de última hora, pelas risadas e obrigada professora Maria Kouyoumdjian pelas orientações e pelo carinho.

Agradeço ao Prof. Dr. João Bosco Pesqueiro e seu grupo os quais possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. José Olavo de Freitas pelas oportunidades de participar e assistir aulas que ficarão marcadas como exemplo.

Agradeço a inspiração de professoras do Departamento de Enfermagem da Unifesp que foram e são incentivos em minha vida. Obrigada Profa. Dra. Mônica Antar Gamba, Profa Dra. Ana Cristina Passarella Bretas e Prof. Dra. Leila Blanes.

Agradeço aos amigos que me ajudaram, apoiaram e principalmente me aturaram durante esses anos. Obrigada Juliana, Isabel, Paulinho, Gorete, Isis, Ana Paty, Ricardo (Farma), Maria Daniella.

Agradeço aos amigos que fiz no edifício “Esqueleto”. Agradeço aos funcionários: “Manu”, Adilson e “Fuzari”. Em especial, obrigada Mayra, por ter sido mais do que uma colega de bancada; Obrigada Vinícius e Daniel, por momentos “deveras divertidos”, Obrigada “Zé” pelo apoio. Agradeço João Rios da Millipore, que se mostrou mais que um vendedor.

Obrigada Michelle Zampiere, por todos os momentos de descontração, por seus conselhos, ajudas, socorros, enfim, por sua real amizade.

Agradeço a equipe do Biotério, Toninho e João por me ajudarem a aprender a manusear os camundongos.

Agradeço a BIREME pela disponibilização da sala de reuniões para minha defesa.

Agradeço a secretária Magali e Valdir da disciplina de Gastroenterologia pela ajuda.

ÍNDICE

	Página
Resumo	01
Abstract	02
Introdução	03
Organização geral do fígado	03
Células estreladas e fibrogênese hepática	07
Modulação hepática do sistema caliceína-cinina	12
Objetivos	14
Materiais e Métodos	15
1. Animais	15
2. Modelos experimentais de fibrose	15
2.a Indução imunológica por soro de porco	15
2.b Indução química por tetracloreto de carbono (CCl ₄)	15
2.c. Indução colestática por ligadura de ducto biliar (BDL)	16
3. Exsanguinação de fígado, <i>in situ</i> .	16
4. Avaliação da fibrogênese	17
4.a. Análise morfométrica	17
4.b. Expressão de proteínas relacionadas a fibrogenese	17
5. Forma de avaliação dos resultados	21
Resultados	22
1. Caracterização dos modelos experimentais	23
1.1 Sobrevida dos animais submetidos aos modelos experimentais	23
1.2 Análise descritiva	26
1.3 Características macroscópicas e histológicas	29
a) Grupos CCl ₄ e soro de porco	29
b) Grupo BDL	32
2. Morfometria	37
3. Expressão de marcadores de fibrogênese	41
3.1 KLF-6	41
3.2 HSP 47	44
Discussão	48
Referências	66
Anexos	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estrutura geral do fígado e sua arquitetura celular	4
2	Heterogeneidade dos hepatócitos das regiões perilobular a centrolobular (zonas I-III)	6
3	Eventos sinusoidais na fibrogênese hepática (A) e características da ativação das células estreladas (B)	8
4	Modelo representativo da análise morfométrica	18
5	Sobrevida dos animais submetidos ao modelo experimental de BDL	25
6	Perfil histológico dos fígados de animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ (KOB ₁) de cininas após indução de fibrose por soro de porco	30
7	Perfil histológico dos fígados de animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ (KOB ₁) de cininas após indução de fibrose por CCl ₄	31
8	Aspecto macroscópico do animal selvagem submetido ao modelo de ligadura do ducto biliar após 1 semana	33
9	Perfil histológico do fígado dos animais selvagens em diferentes tempos após ligadura do ducto biliar (aumento de 100x)	34
10	Perfil histológico dos fígados de animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas submetidos ao modelo experimental de ligadura do ducto biliar ao final de 8 semanas (aumento de 100x)	36
11	Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (KOB ₁) após indução de fibrose por soro de porco	38
12	Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (KOB ₁) após indução de fibrose por CCl ₄	39
13	Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas após 8 semanas de ligadura do ducto biliar	40
14	Perfil representativo do <i>blotting</i> para KLF-6 no homogenato de fígado de animais selvagens e/ou <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (KOB ₁) após indução de fibrose por CCl ₄ , soro de porco ou ligadura do ducto biliar (BDL)	42
15	Perfil representativo do <i>blotting</i> e quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de soro de porco	45
16	Perfil representativo do <i>blotting</i> e quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de CCl ₄	46
17	Quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de ligadura do ducto biliar	47
18	Participação dos diferentes tipos celulares na cascata fibrogênica	49
19	Entrega de lipossomo acoplado a vitamina A às células estreladas	54
20	Sumário das respostas hepáticas aos diferentes modelos experimentais analisados por análise morfométrica e expressão de B ₁	59
21	Proposta da ativação de mediadores da fibrogênese e papel do receptor B ₁ de cininas	60
22	Possíveis locais de ação da ativação do receptor B ₁ na proteção contra fibrose	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Distribuição dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (KOB ₁) nos grupos CCl ₄ , soro de porco e ligadura do ducto biliar (BDL)	24
2	Peso dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (a), dos respectivos fígados (b) e relação fígado/peso dos animais (c) após indução de fibrose por CCl ₄ ou soro de porco	27
3	Peso dos animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ (KOB ₁) de cininas (a), dos respectivos fígados (b) e relação fígado/peso dos animais (c) após indução de fibrose por ligadura do ducto biliar (BDL)	28
4	Escore de fibrose em animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas submetidos ao modelo de ligadura do ducto biliar em função do tempo de indução	35
5	Padrão de expressão do KLF-6 no fígado de animais selvagens e <i>knockout</i> de receptor B ₁ de cininas (KOB ₁) após indução de fibrose por CCl ₄ , soro de porco ou ligadura do ducto biliar (BDL)	43
6	Sumário das respostas hepáticas aos diferentes modelos experimentais analisados por análise morfométrica e expressão de HSP 47	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDL	Ligadura de ducto biliar
BK	Bradicinina
CCL ₃	Triclorometil
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
HSP47	Proteína de choque térmico 47
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
KLF-6	Fator de transcrição tipo- <i>Kruppel</i> 6
LMWK	Cininogênio de baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
MMPs	Metaloproteinases
NO	Óxido nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador - β 1
TIMP	Inibidor de metaloproteinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular

RESUMO

As ações biológicas e os efeitos farmacológicos da bradicinina (BK) são mediados por dois receptores, um constitutivo (B₂R) e outro induzido (B₁R). No fígado, nós verificamos que a resposta hipertensiva portal à BK é mediada por receptores B₂, mas não por receptores B₁, tanto em ratos normais quanto naqueles submetidos a diferentes agentes de agressão hepática. Nesta última situação verificamos que há aumento da expressão de B₁R com a progressão para a cirrose. O objetivo deste trabalho é verificar se o B₁R está envolvido no processo de fibrogênese. Para tanto 3 modelos experimentais de fibrose foram utilizados em camundongos *knockout* de B₁R (KOB₁R) e selvagens: a) com injeções intraperitoniais (*ip*) de CCl₄ (6 semanas); b) injeções *ip* de soro de porco (10 semanas) e c) ligadura do ducto biliar (BDL). Após uma semana da última injeção, os fígados foram exanguinados, retirados, pesados e processados. A fibrose foi avaliada por análise histológica (coloração com Picrus-Sirius), e quantificada pelo programa AxionVision 4.5 da Carl Zeiss. Avaliação da fibrogênese foi estudada pela expressão de “heat shock protein”-47 (HSP 47) analisada por Western Blotting. A indução da fibrose com CCl₄ foi obtida com sucesso nos camundongos selvagens e KOB₁R, com o tradicional padrão de formação de septos hexagonais. O modelo BDL apresentou fibrose com padrão característico de colestase em ambos animais. Pela análise morfométrica, a quantidade de colágeno (% da área total) nos animais KOB₁R-CCl₄ ($1,9 \pm 0,3$, n=5) é significativamente maior (ANOVA, p = 0,006) que nos animais selvagens-CCl₄ ($1,0 \pm 0,2$, n=7), bem como quando comparado com o respectivo controle (KOB₁R-óleo) ($0,4 \pm 0,3\%$, n=3). Por outro lado, a quantidade de colágeno nos animais KOB₁R-BDL ($3,1 \pm 1,4$, n=5) é significativamente menor que nos selvagens ($16,1 \pm 3,1$, n=6). A expressão de HSP 47 está significativamente (t-test, p = 0,04) aumentada nos animais KOB₁R ($10,6 \pm 1,6 \times 10^6$ UA), comparada aos animais selvagens ($6,1 \pm 1,3 \times 10^6$ UA), ambos tratados com CCl₄, confirmando o pior padrão de fibrose observado também na quantificação morfométrica. No modelo de BDL, houve também maior expressão de HSP 47 nos animais KOB₁R que nos animais selvagens. Em conclusão, nossos resultados demonstram a participação do sistema caliceína-cinina na fibrogênese hepática e sugere que a ativação do B₁R protege o fígado da fibrose hepática no modelo de CCl₄, mas não no modelo BDL. Estes dados são importantes considerando o potencial terapêutico com o uso de agonistas no tratamento e/ou prevenção da fibrose.

ABSTRACT

The biological and pharmacological effects of bradykinin (BK) are mediated by a constitutive B₂ and induced B₁R. In the liver, we verified that the portal hypertensive response to BK is mediated by B₂R, but not by B₁R, in normal rats and those submitted to different kind of hepatic injury. In the latter, we also verified an increased expression of B₁R in relation to the progression of the cirrhosis. The aim of this work is to analyze the role of BK in the fibrogenesis in wild and knockout of B₁R (KOB₁R) mice. Three models of fibrosis were used: a) intraperitoneal (ip) injection of CCl₄ (6 weeks); b) *ip* injection of porcine serum (10 weeks) and c) bile duct ligation (BDL). After one week of injection, the liver were exsanguinated, removed, weighted and processed. Fibrosis was evaluated by histological analysis (Picrus-Sirius staining) and quantified by AxionVision 4.5 software (Carl Zeiss). Fibrogenesis was evaluated by heat shock protein-47 (HSP 47) expression by Western Blotting. Porcine serum did not induce fibrosis in all animals. CCl₄ induced fibrosis in wild and KOB₁R in the traditional pattern with hexagonal septa. BDL resulted in fibrosis with the characteristic pattern of colestasis. By morphometric analysis, hepatic collagen (% of total area) of KOB₁R-CCl₄ ($1,9 \pm 0,3$, n=5) was significantly higher (ANOVA, $p = 0,006$) than in wild-CCl₄ ($1,0 \pm 0,2$, n=7). On the other hand, hepatic collagen in KOB₁R-BDL ($3,1 \pm 1,4$, n=5) is lower than in wild mice ($16,1 \pm 3,1$, n=6). The liver HSP 47 expression in CCl₄ model is significantly (t-test, $p = 0,04$) higher in KOB₁R ($10,6 \pm 1,6 \times 10^6$ UA), compared to wild mice ($6,1 \pm 1,3 \times 10^6$ UA). Interestingly, hepatic HSP 47 expression in KOB₁R was also higher than in wild mice. In conclusion, our results suggested that bradykinin participates in the fibrogenesis, and probably activation of B₁R protects liver from hepatic fibrosis in the CCl₄ model, but not in BDL model. This data is important considering the potential therapeutic with the use of agonist in the threatment and/or prevention of liver fibrosis.

INTRODUÇÃO

Organização geral do fígado

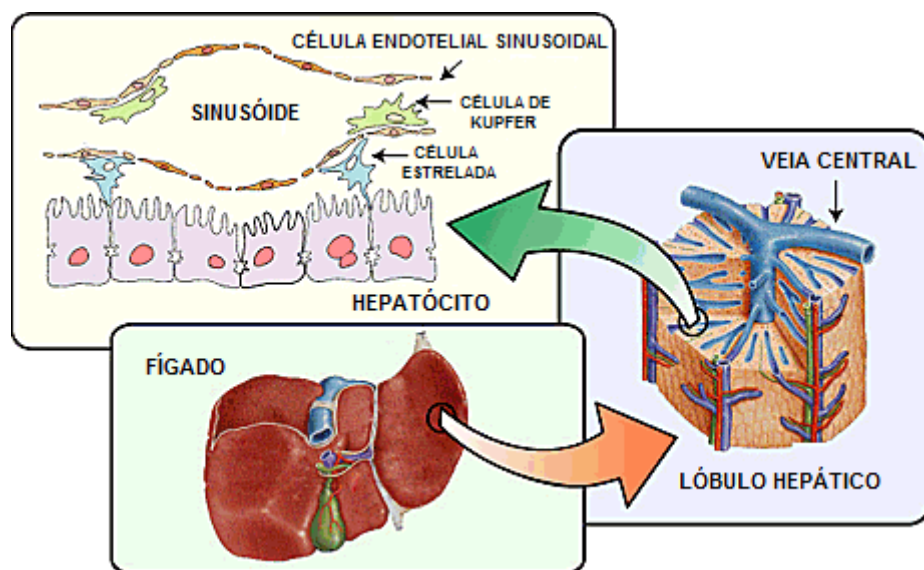
O fígado é a maior massa de tecido glandular do nosso organismo e a estratégica posição entre o trato digestivo e o meio interno, confere ao órgão a função de modulador do meio interno. Em condições normais, as substâncias absorvidas pelo intestino fluem para o fígado antes de atingir a circulação e, portanto, estão sujeitas a eliminação pré-sistêmica (Desmet, 1994). O fígado é órgão metabólico e também glândula secretória: produz e secreta bile e produz substâncias que são enviadas a outros órgãos e tecidos.

No fígado adulto de mamíferos encontramos diferentes tipos celulares (Figura 1). As células parenquimais (hepatócitos) correspondem a 65% do volume do órgão e apresentam como principais funções: absorção, processamento e estocagem de nutrientes transportados pelo intestino, síntese e secreção de proteínas plasmáticas e produção de bile (Desmet, 1994). As células não parenquimais ou sinusoidais correspondem a 35%, sendo compostas por células endoteliais, células de Kupffer, células estreladas e as células *natural killer*. As células endoteliais sinusoidais perdem a membrana basal e formam camada de células com fenestras, que controlam a troca de material entre sangue e parênquima. As células de Kupffer são as primeiras células a serem expostas aos materiais absorvidos pelo trato gastrointestinal, participando da resposta imune inata e da expressão e secreção de mediadores inflamatórios locais. As células estreladas são as principais células envolvidas no processo da fibrose e sua atuação será descrita adiante. As células *natural killer* são células linfóides que contém grânulos específicos na qual desempenham papel de exterminadoras (Wisse *et al.*, 1997; Nakatani *et al.*, 2004).

A organização estrutural destas células reflete a importante função metabólica do fígado. As células parenquimais aparecem de forma homogênea numa visão microscópica, mas análise mais profunda revela que o fígado é classicamente dividido em lóbulos

Figura 1

Estrutura geral do fígado e sua arquitetura celular



hexagonais subdivididos em unidades triangulares, o ácino (a unidade funcional) (Ohno *et al.*, 2008) (Figura 1).

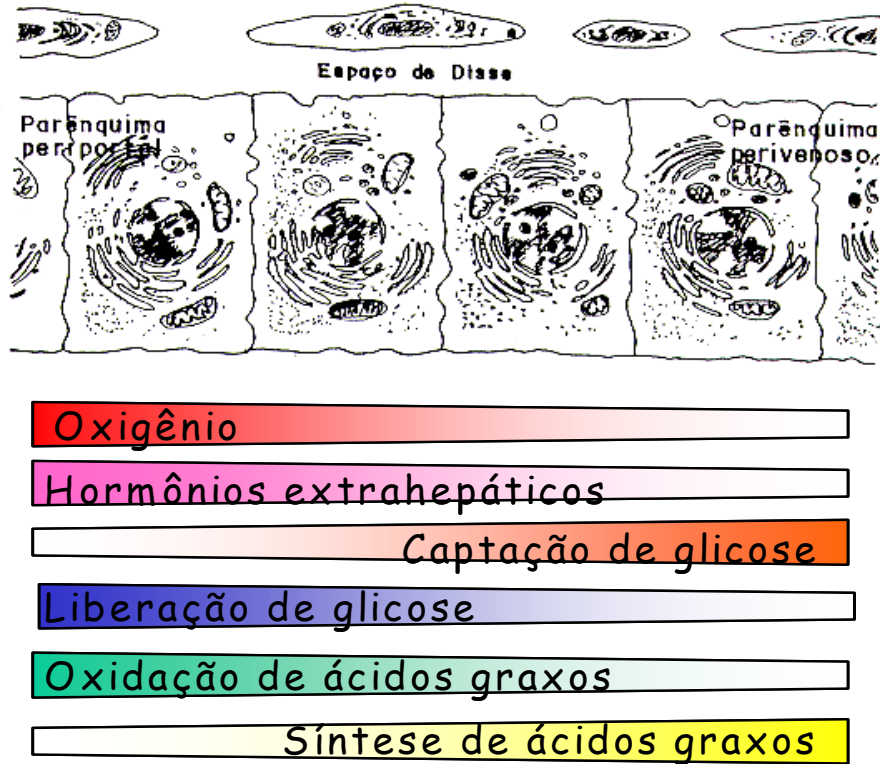
A unidade intra-hepática vascular é formada por vênulas portais, arteríolas hepáticas, sinusóides, vênulas centrais e vasos linfáticos. São nos sinusóides onde as maiores quantidades de células responsáveis pelo controle hemodinâmico são encontradas (McCuskey, 2000). Por contração, os sinusóides reduzem seletivamente o diâmetro do seu lúmen, alterando o grau da velocidade e distribuição do fluxo sanguíneo (McCuskey, 1966). Assim, a vasculatura hepática tem exercido especial atenção, juntamente com os seus mediadores, na compreensão de mecanismos fisiológicos e/ou patológicos, da modulação do fluxo sanguíneo (Rockey, 2003).

O ácino hepático pode ser dividido em três zonas metabólicas (zonas 1, 2 e 3), e devido ao afastamento progressivo das zonas em relação ao suprimento sanguíneo e ao mesmo tempo com aproximação das vênulas hepáticas, encontram características próprias em cada região (Ohno *et al.*, 2008). Essa distribuição em zonas forma um gradiente lobular de nutrientes e de atividade para muitas enzimas hepáticas (Jungermann & Kietzmann, 1996; Ohno *et al.*, 2008). A zona 1 é a região mais próxima da veia porta e da artéria hepática, e portanto mais agredida em situações de estresse; zona 2 está situada numa posição intermediária e a zona 3 em contato com as vênulas hepáticas, apresentando menor quantidade de oxigênio, porém, maiores quantidades de substâncias endógenas (Figura 2). As células sinusoidais também apresentam variação zonal em relação à morfologia. As células encontradas na zona 1 são menores e tortuosas, com diâmetro maior e com forma mais alongada do que nas demais regiões. A perda desta heterogeneidade ocorre somente em situações patológicas, como a cirrose. Neste caso, o fígado em resposta à agressão crônica desenvolverá fibrose, formação de cicatrizes, distorção da arquitetura tecidual e alterações na vascularização, finalizando com a formação de nódulos de hepatócitos circundados por tecido fibroso (Desmet, 1994).

Figura 2

Heterogeneidade dos hepatócitos das regiões perilobular a centrolobular (zonas I-

III)



(adaptado de Junqueira & Carneiro, 1995)

Células estreladas e fibrogênese hepática

Situadas no espaço de Disse, as células estreladas localizam-se entre as células endoteliais do sinusóide e as células do parênquima hepático (Haruki, 2004) e representam aproximadamente 5 a 8% do número total das células presentes no fígado normal (Rockey, 2006).

Por apresentarem filamentos contráteis, túbulos e proteínas, as células estreladas estão relacionadas à modulação do tônus intra-hepático vascular e consequente resistência hepática (McCuskey *et al.*, 1993, Rockey, 2006). Em condições fisiológicas, apresentam-se na forma quiescente e são responsáveis pelo transporte e armazenamento de retinóides e seus metabólitos (Haruki, 2004).

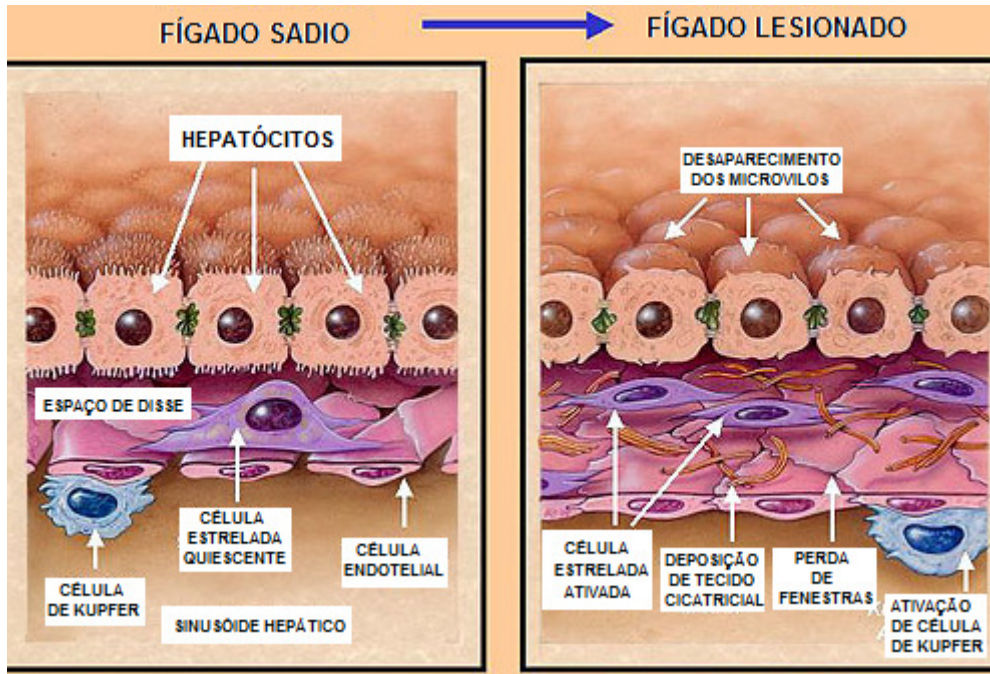
Numa lesão hepática de qualquer etiologia, as células estreladas sofrem processo de “ativação”, na qual mudam o seu fenótipo de quiescente para proliferativo, perdem seu conteúdo lipídico, passam a produzir colágeno e a apresentar processos citoplasmáticos alongados e contráteis, interagindo com tipos celulares vizinhos por sintetizar e secretar citocinas, fatores de crescimento e a expressão de receptores de citocinas (Friedman, 2000; Geerts *et al.*, 1994) (Figura 3A).

O processo de ativação é compreendido em iniciação ou estágio pré-inflamatório, perpetuação e resolução (Friedman, 2000) (Figura 3B). A iniciação dá-se quando o fígado sofre alguma lesão, por meio de estimulação parácrina e por espécies reativas de oxigênio e citocinas (Friedman, 2000). O fenótipo ativado é caracterizado pela formação de septos de tecido conectivo e pelo aumento da síntese de colágeno tipo I e III (Geerts *et al.*, 1994; Pinzani & Marra, 2005).

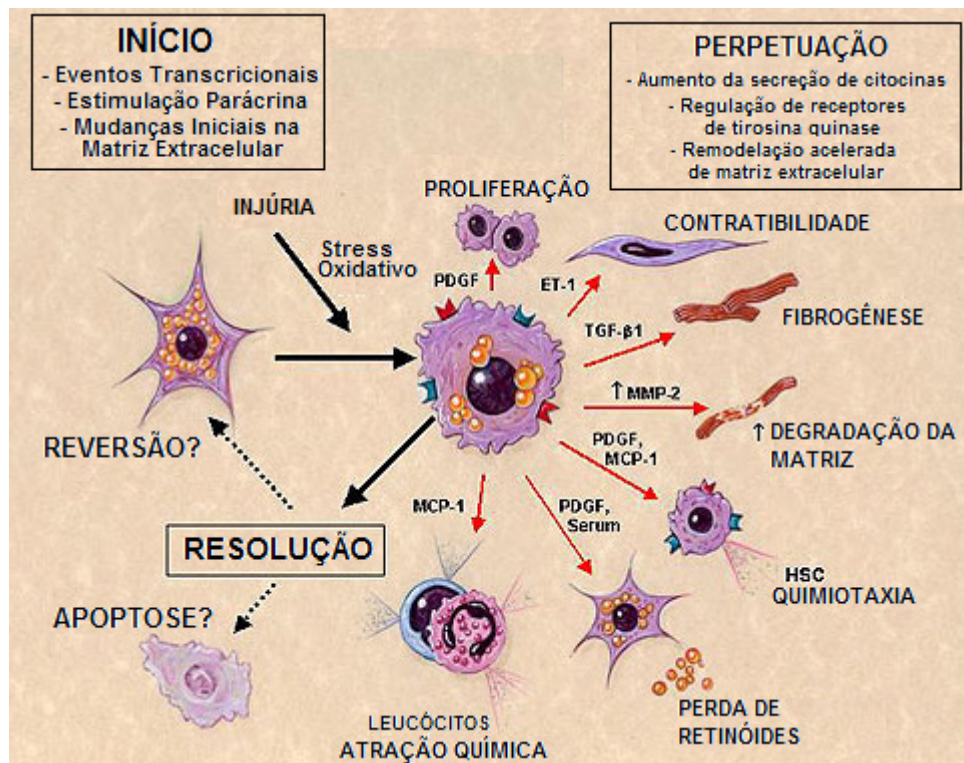
Figura 3

Eventos sinusoidais na fibrogênese hepática (A) e características da ativação das células estreladas (B)

A)



B)



Na perpetuação, temos eventos celulares que conduzem a intensa transformação fenotípica e metabólica, entre eles o aumento na expressão de receptores e resposta à citocinas que coletivamente levam ao acúmulo de matriz extracelular (Friedman, 2000). Durante a perpetuação, fazem parte das respostas fenotípicas desenvolvidas pela célula estrelada: a proliferação, a contratilidade, o desenvolvimento da fibrogênese, a degradação dos componentes da matriz extracelular, a quimiotaxia, a perda de retinóides, a liberação de citocinas e a quimioatração de leucócitos (Reynaert *et al.*, 2002) (Figura 3B).

O último evento celular pode apresentar dois destinos: 1. reversão da célula ativada em quiescente, pela participação de interleucinas através da diminuição da atividade inflamatória, com aumento da atividade intersticial de collagenase; e, 2. apoptose (Friedman, 2000).

Aspectos moleculares e celulares da célula estrelada tanto quiescente quanto ativada tem sido estudados (Friedman, 2008a) e seus achados corroboram para a importância da utilização de marcadores para o estudo da célula, entre eles podemos citar proteína de choque térmico 47 (*Heat shock protein*, HSP 47) e fator de transcrição tipo-*Kruppel* 6 (KLF-6) (Van de Bovenkamp M *et al.*, 2005).

Proteína de choque térmico 47 (HSP 47) é chaperona específica para colágeno (Nagata, 1996) e é expressa em fígado, exclusivamente em células estreladas, miofibroblastos e células vasculares (Kawada *et al.*, 1996). Expressão de HSP 47 pelas células estreladas é aumentada durante a ativação espontânea destas células em cultura (Van de Bovenkamp *et al.*, 2005) e após a indução de cirrose por tetracloreto em modelos *in vivo* (Masuda *et al.*, 1994; Kawada *et al.*, 1996; Ikejima *et al.*, 2001). Resultados demonstram o envolvimento de HSP 47 na infiltração de macrófagos na patogênese da fibrose em rins transplantados (Abe *et al.*, 2000).

Fatores de transcrição tipo-*Kruppel* são subclasse da família de fatores de transcrição ligantes de DNA tipo dedo de zinco (*zinc fingers*) (Atkins & Jain, 2007).

Sua nomenclatura é derivada da palavra em alemão para aleijado (*cripple*). A proteína recebe esse nome devido a embriões de *Drosophila* homozigóticos para a proteína *Krüppel* apresentarem alteração no abdome anterior e nos segmentos torácicos, resultando em sua morte (Nusselein-Volhard & Wieschaus, 1980).

A ativação de células estreladas induz a produção de KLF-6 (Van de Bovenkamp *et al.*, 2005; Atkins & Jain, 2007). Sua expressão gênica está relacionada com lesão hepática, vascularização e remodelação. Estando envolvido com a produção de colágeno tipo I e fator de crescimento transformante tipo I e II (Atkins & Jain, 2007).

Para melhor caracterizar estes processos na fibrogênese, modelos animais são utilizados e podem ser classificados pela etiologia. São conhecidos os modelos tóxicos, nutricionais, imunológicos, colestático, alcoólico, genético, metabólico e transgênico. Cada modelo apresenta características únicas na patogênese da fibrose ou cirrose e podem ser adaptados a propósitos específicos.

O tetracloreto de carbono (CCl₄) é agente tóxico comumente usado para indução de fibrose hepática e cirrose em animais, causando destruição de hepatócitos e processo inflamatório importante durante estágios iniciais de intoxicação (Jiang *et al.*, 1992). Após o período de 6 a 9 semanas de indução, aspectos histológicos como necrose do parênquima, infiltração inflamatória e deposição de tecido conectivo podem ser observados (Jiang *et al.*, 1992). Metabólitos reativos de CCl₄, como o triclorometil, produzem espécies reativas de oxigênio, causando peroxidação lipídica que é responsável pelos danos hepatocelulares e pela ativação de células estreladas, gerando produção anormal de diversos componentes da matriz extracelular (Liu *et al.*, 1995).

Repetidas injeções de soro de porco em ratos durante um período prolongado causam fibrose hepática sem dano hepatocelular e simultaneamente, resposta imune (Bhunchet *et al.*, 1996). Muitos estudos voltados para a compreensão dos mecanismos de indução da fibrogênese hepática por soro de porco permanecem não claros. No entanto, sabemos que esse modelo é importante para o estudo das mudanças estruturais tais

como a capilarização e venularização que ocorrem durante a fibrogênese (Bhunchet & Wake, 1992). Capilarização é caracterizada pelo desenvolvimento de lâmina basal e perda das fenestras das células endoteliais sinusoidais, enquanto venularização é caracterizada pela transformação de vênulas a partir dos sinusóides (Bhunchet & Fujieda, 1993).

A fibrose colestática dá-se pelo modelo de ligação de ducto biliar (BDL). Caracterizado por significativa infiltração de tecido conectivo na região portal e aumentada proliferação das células epiteliais do ducto biliar e hepatócitos (Aldana *et al.*, 1994), é freqüentemente usado para o estudo da expressão da matriz extracelular e sua regulação (Takahara *et al.*, 1995).

Modulação hepática do sistema calicreína-cinina

O fígado tem papel fundamental na modulação do sistema calicreína–cinina, pois sintetiza cininogênios (Borges & Gordon, 1976) e pró–calicreína (Borges *et al.*, 1981).

Os cininogênios são substâncias que apresentam múltiplos domínios em sua molécula. No homem, encontramos o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) composto por 626 aminoácidos, apresentando peso molecular de 88 a 114 kDa, e o cininogênio de baixo peso molecular (LMWK) composto por 409 aminoácidos e peso molecular de 50 a 68 kDa. Em ratos, encontramos o T–cininogênio, proteína de fase aguda (Greenbaum, 1986). Por apresentar características diferentes do LMWK, o HMWK apresenta propriedades que lhe confere participação no sistema de coagulação intrínseca do nosso organismo (Marceau *et al.*, 1998).

A pró–calicreína plasmática é glicoproteína de cadeia única sintetizada pelo fígado, e liberada na corrente sanguínea, onde irá circular complexada ao HMWK, convertida em sua forma ativa (calicreína) pelo fator XIIa pela ação da trombina, por proteólise limitada (Borges *et al.*, 1981). Em mamíferos, conhecemos dois tipos de calicreínas: plasmática e tecidual, que se diferem pelos genes que codificam, pelas cininas produzidas e pelas suas propriedades físico–químicas (Margolius, 1995; Marceau *et al.*, 1998).

Participando do processo inflamatório, a pró–calicreína plasmática atua juntamente com o fator de Hageman e com o HMWK nas vias de coagulação intrínseca, na fibrinólise, angiogênese, trombose e na migração quimiotática de leucócitos polimorfonucleares (Kouyoumdjian *et al.*, 2005). Sendo que em humanos, sua concentração é indicador sensível da capacidade da síntese hepática (Manoukian & Borges, 1984), além de indicador prognóstico na insuficiência hepática crônica (Agnholt *et al.*, 1990).

As cininas, em especial a bradicinina (BK), foi descoberta em 1948 pelos cientistas: Maurício Rocha e Silva, Wilson T. Beraldo e Gastão Rosenfeld; onde descreveram um agente que gerado em plasma humano pela ação do veneno da *Bothrops jararaca* ou da tripsina mostrava importante ação hipotensora arterial em gatos e coelhos e ação estimulante da contração da musculatura intestinal e uterina de cobaia. Recebeu o nome de bradicinina, do grego *brady*, lento, e *kinesia*, movimento (Rocha e Silva *et al.*, 1949).

No início da década de 60 a estrutura primária da BK (R-P-P-G-F-S-P-F-R) foi elucidada. No fígado, BK é potente peptídeo vasoativo, apresentando efeito hipertensivo portal (Borges *et al.*, 1976). A BK é hidrolisada a partir do HMWK, pela ação da calicreína (Marceau *et al.*, 1998).

As cininas apresentam suas ações biológicas e seus efeitos farmacológicos através da mediação de dois receptores denominados B₁ (induzido) e B₂ (constitutivo). Estes efeitos estão relacionados à regulação inflamatória, vascular e processos incluindo angiogenicidade, permeabilidade tecidual, contração das células musculares lisas e vasodilatação (Hall, 1992; Cyr *et al.*, 2001; Marceau *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2002; Kouyoumdjian *et al.*, 2005).

O papel das cininas nas doenças hepáticas é pouco conhecido. Recentes resultados de nosso Laboratório mostraram que durante vários estágios de agressão hepática, de inflamação a cirrose, o receptor B₁ é expresso, em ratos, mas não participa da resposta hipertensiva portal as cininas (Nagaoka *et al.*, 2006). Dados preliminares mostraram que a indução do receptor B₁ em ratos não alterou nenhum parâmetro metabólico, como produção de bile, liberação de glicose e depuração de bromosulfaleína. Mas interessante, o nível de expressão de receptor B₁ aumenta conforme a progressão da cirrose como observado por *Western Blotting* (Nagaoka *et al.*, 2006), sugerindo um papel deste receptor na fibrogênese hepática.

OBJETIVO

Comparar a fibrogênese hepática induzida em camundongos selvagens com a induzida em camundongos *knockout* de receptor B₁ da bradicinina.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos adultos *knockout* do receptor B₁ da bradicinina (129/J background) e selvagens (129/J), pesando de 20 a 30g. Foram mantidos sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz claro/escuro de 12h e 60-90% de umidade e com dieta livre.

Os animais *knockout* do receptor B₁ da bradicinina, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da UNIFESP e obtidos pelo Prof. Dr. João Bosco Pesquero do Departamento de Biofísica da UNIFESP, apresentaram deleção da sequência gênica que codifica o receptor B₁ da bradicinina (Pesquero *et al.*, 2000).

Todos os experimentos foram realizados de acordo com “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (CIOMS, 1985) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (CEP 06/0097).

2. Modelos experimentais de fibrose

Os modelos experimentais foram caso-controle, fechado e randomizado pelo orientador do projeto através do uso de códigos pré-colocados nas caixas dos animais e nas seringas já preparadas para o uso do pesquisador, evitando assim a interferência do mesmo nos resultados.

2.a. Indução imunológica por soro de porco (Bhunchet & Wake, 1998).

Camundongos receberam injeção intraperitoneal de 0,1 mL de soro de porco (Gibco RBL, EUA) duas vezes por semana, em dias alternados, por 10 semanas. Os experimentos foram realizados uma semana após a última injeção.

2.b. Indução química por tetracloreto de carbono (CCl₄) (Gandhi *et al.*, 1996).

Camundongos receberam injeção intraperitoneal de CCl₄ (1 mL CCl₄/Kg de peso) (Merck, Alemanha) diluído (1:4) em óleo de milho, três vezes por semana, em dias alternados, no período de 6 semanas. O grupo controle recebeu o mesmo volume do

veículo (óleo de milho). Os experimentos foram realizados uma semana após a última injeção.

2.c. Indução colestática por ligadura de ducto biliar (BDL) (Chang *et al*, 2005).

Camundongos foram anestesiados com mistura de isoflurano (Baxter, Brasil) inalatório a 1,5%, óxido nitroso a 0,8 L/min e oxigênio medicinal a 0,4 L/min para indução anestésica. Tricotomia do animal e assepsia do plano cirúrgico com álcool iodado a 1% (Rioquímica, Brasil) foram realizadas. A temperatura corporal do animal (37 °C) foi mantida através da mesa cirúrgica aquecida (Prisma, Brasil).

Após laparotomia, com auxílio de microscópio cirúrgico (Nikon, Japão), ducto biliar comum foi localizado, isolado e duplamente ligado com fio de seda 6-0 e seccionado entre as suturas. As alças abdominais foram colocadas de volta à cavidade abdominal e os planos foram fechados com fio de seda preto 6-0. No pós-operatório, os animais receberam analgesia com dipirona sódica e permaneceram sob regime de água e sacarose (10%) por 24 horas, quando retornaram ao livre acesso de comida e água. Os animais do grupo controle (*sham*) passaram pelo mesmo procedimento, porém, não tiveram seu ducto biliar duplamente ligado e seccionado. A remoção do fígado do animal foi realizada logo após o tempo determinado que variou de 30 minutos até 8 semanas.

3. Exsanguinação de fígado, *in situ*.

As exsanguinações foram realizadas segundo descrito por Borges & Kouyoumdjian (1992). Os animais foram anestesiados (1,3 mg/g peso) com injeção intraperitoneal de solução aquosa de uretana (200 g/L) e pesados. Em seguida, a cavidade abdominal foi aberta e a veia porta foi canulada.

A exsanguinação foi obtida com 50 mL de solução de Krebs em circuito aberto após abertura da cavidade torácica e canulação da veia cava inferior acima do diafragma. Após exsanguinação, os fígados foram cuidadosamente retirados, pesados e

processados. Amostras de fígado foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para posterior análise. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato-salina (PBS) e corados com picrus-sirius para análise morfométrica.

4. Avaliação da fibrogênese

4.a. Análise morfométrica

Utilizamos para análise o processador e o analisador de imagem Axiovision versão 4.5 da Zeiss (Alemanha) e o microscópio Axiolab (Zeiss). Foram digitalizados cinco campos microscópicos aleatórios de cada corte histológico com aumento de 100 vezes. As imagens foram processadas pelo programa onde parênquima, colágeno e espaço em branco receberam a cor verde, vermelha e azul, respectivamente, como apresentado na Figura 4. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da área total (média $\pm$ EPM).

4.b. Expressão de proteínas relacionadas à fibrogênese (van de Bovenkamp *et al.*, 2005)

A fibrogênese foi estudada pela expressão da proteína de choque térmico 47 (*heat shock protein*, HSP 47) e fator de transcrição tipo-*Kruppel* 6 (KLF6), analisada por *Western Blotting*, utilizando anticorpos monoclonais específicos.

✓ Homogenato

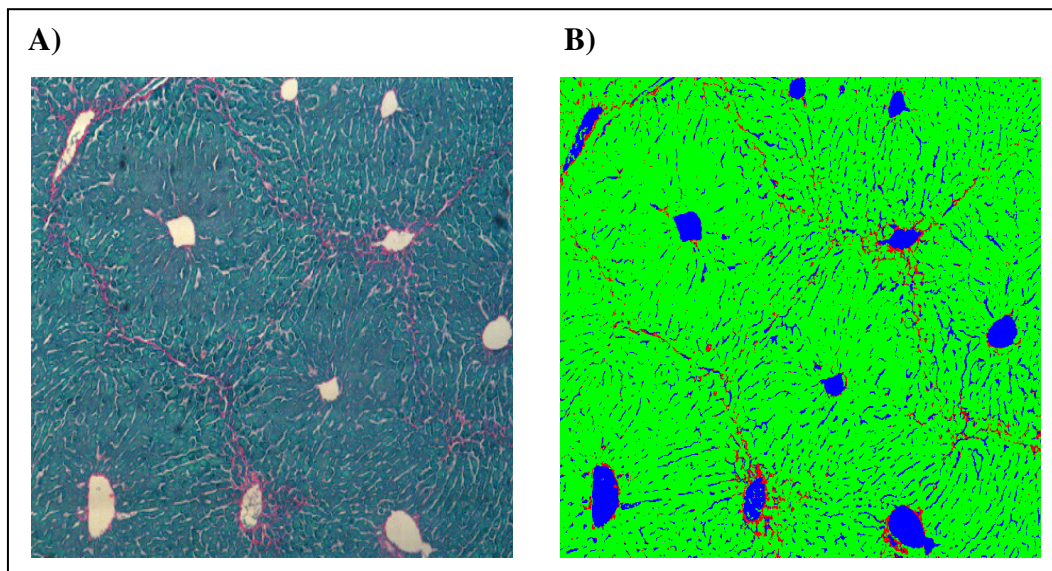
Tecido hepático (100 mg) foi homogeneizado em 1 mL de tampão de lise contendo cloreto de sódio 150 mmol/L, Tris 50mmol/L, Nonidet P-40 1%, Desoxicolato 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, e coquetel de inibidores de proteases. As amostras foram mantidas sob agitação a 4°C por 30 minutos e centrifugadas a 15.000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C até o momento de sua análise.

Essas amostras tiveram as proteínas quantificadas pelo método de Bradford utilizando a albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976).

Figura 4

Modelo representativo da análise morfométrica:

- A) Lâmina corada com Picrus-Sirius B) Lâmina após processamento pelo Programa Axiovision da Zeiss**



✓ ***Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)***

Proteínas do homogenato de fígado foram separadas em eletroforese de gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970).

O gel de corrida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1%, 3 µL de Tetrametiletilenediamina (Temed) e 30 µL persulfato de amônio 10%, em volume final de 6 mL, e colocado entre placas de vidro de 1 mm de espessura. Após este ter polimerizado, adicionamos o gel de empilhamento com 4,5% de acrilamida, juntamente com o “pente”, para a formação das fendas.

As amostras aplicadas nas fendas apresentaram 50 µg de proteína para KLF-6 e 10 µg para HSP 47 em volume final de 30 µL de tampão TrisHCl 0,15 M pH 6,8, SDS 2%, glicerina 5% e azul de bromofenol 0,006%. As proteínas migraram em voltagem inicial de 90 V (gel de empilhamento) e depois na voltagem constante de 100 V no gel de corrida, à temperatura ambiente.

Após o marcador ter corrido 90% da sua extensão, a eletroforese foi interrompida e o gel transferido para tampão de transferência para o início do *Immunoblotting*.

✓ ***Immunoblotting***

A transferência de proteína para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) foi realizada em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375%, metanol 20% v/v), com corrente de 0,8 mA/cm² de gel por 1 hora e 35 minutos, pelo método semi-seco com o aparelho *Trans-blot SD Transfer cell* (BioRad, EUA).

A membrana de PVDF foi pré-cortada no tamanho aproximado do gel de poliacrilamida e imersa em metanol por 10 segundos. Em seguida foi lavada em água destilada e colocada em tampão de transferência até sua utilização.

O “sanduíche” para transferência foi montado na seguinte sequência: eletrodo (pólo positivo), 1 folha de papel de filtro (BioRad, EUA) embebidos no tampão,

membrana de PVDF, gel de poliacrilamida, 1 folha de papel filtro embebidos no tampão, eletrodo (pólo negativo).

Após a transferência, o gel foi corado com solução brilhante de Coomassie e o fundo descorado com várias trocas de solução de ácido acético 7,5% e etanol 25% para certificação da transferência das proteínas. A membrana de PVDF foi lavada várias vezes no Sistema de Detecção de Proteína *SNAP i.d.* (Millipore, EUA) em PBS acrescido de 0,2% de Tween 20 (T).

Para o bloqueio, a membrana foi incubada em solução contendo 5% de albumina em PBS-T por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, a membrana foi lavada com várias trocas de PBS-T e incubada com o anticorpo primário (KLF-6 1:500 ou HSP 47 1:15000 da StressGen Biotechnologies) diluído em solução de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), durante a noite, a 4°C, sob leve agitação. Após várias lavagens da membrana com PBS-T, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário acoplado a peroxidase (1:1000 ou 1:50000 para KLF-6 e HSP 47 respectivamente) por 4 horas a temperatura ambiente sob agitação constante.

Para os experimentos com KLF-6, decorrido o tempo de incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi previamente lavada com PBS-T e incubada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) sem H₂O₂ por 15 minutos no escuro. A seguir foi incubada com solução de DAB contendo H₂O₂ sob agitação constante até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a lavagem da membrana com PBS.

Para os experimentos de HSP 47, decorrido o tempo de incubação com o anticorpo secundário, a membrana, previamente lavada em PBS-T, foi incubada com o *kit Immobilon Western* (Millipore, EUA) por 1 minuto no escuro. A seguir a membrana foi colocada no cassete e exposta ao filme de raio X até o aparecimento das bandas. Para a revelação do filme, utilizamos revelador e fixador Kodak (Brasil).

As bandas visíveis foram fotografadas e quantificadas pelo aparelho LAS-3000 (Fujifilm, EUA), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Hugo P. Monteiro, do Departamento de Bioquímica da UNIFESP.

5. Forma de avaliação dos resultados

Os resultados foram expressos por média $\pm$ EPM e analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 3.0).

Para análise estatística foi utilizado o programa Primer of Statistics (Mc Graw-Hill, version 3.02) sendo o teste utilizado test t-Student ou a análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni, quando necessário. O nível de significância para rejeição da hipótese nula foi considerado inferior ou igual a 0,05.

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em três seções:

1. Caracterização dos modelos experimentais: apresentaremos as medidas descritivas relacionadas ao peso dos animais, do fígado e peso relativo (fígado/animal) nos modelos experimentais estudados, juntamente com a respectiva análise histológica.
2. Morfometria: serão apresentadas as quantificações da fibrose analisadas nas preparações histológicas do fígado dos animais submetidos aos modelos experimentais estudados.
3. Expressão de proteínas relacionadas a fibrogênese: serão apresentadas as expressões das proteínas KLF-6 e HSP 47 no fígado dos animais estudados.

2. Caracterização dos modelos experimentais

Neste trabalho foram realizados três modelos experimentais de fibrose: injeção intraperitoneal (*ip*) de tetracloreto de carbono (CCl₄), injeção *ip* de soro de porco ou ligadura do ducto biliar (BDL), cuja caracterização está apresentada a seguir.

2.1. Sobrevida dos animais submetidos aos modelos experimentais

O trabalho utilizou uma população de 155 animais, no entanto fizeram parte da amostra 112 camundongos, sendo 98 selvagens e 57 *knockout* de receptor B₁ de cininas (KOB₁) (Tabela 1). A porcentagem de morte nos animais KOB₁ foi mais prevalente (73%) no grupo BDL, onde observamos maior sensibilidade destes animais à anestesia e ao procedimento cirúrgico.

A curva de sobrevida de parte dos animais submetidos ao modelo BDL está apresentada na Figura 4, onde podemos observar que a sobrevida dos animais KOB₁ é significativamente (*survival curve analysis - prism*, $p = 0,0365$) menor que os animais selvagens submetidos a BDL.

Tabela 1

Distribuição dos animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas (KOB₁) nos grupos CCl₄, soro de porco e BDL

	Selvagem			KOB ₁		
	Total	Óbitos	%	Total	Óbitos	%
Veículo (Óleo)	5	0	0	5	0	0
CCl₄	17	4	24	14	1	5
Soro de porco	8	1	12	8	0	0
Controle (<i>sham</i>)	23	0	0	4	0	0
BDL	45	18	40	26	30	73
Total	98			57		

Legenda:

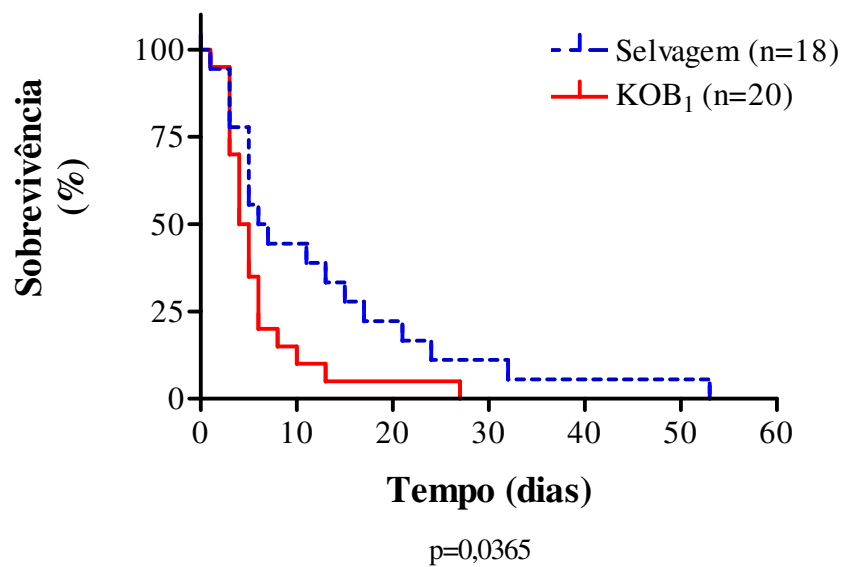
Grupo CCl₄: Camundongos receberam injeção *ip* de CCl₄ (1 mL CCl₄/Kg de peso) diluído (1:4) em óleo de milho, três vezes por semana no período de 6 semanas. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (óleo de milho). Após 1 semana, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

Grupo soro de porco: Animais receberam injeção *ip* de 0,1 mL de soro de porco duas vezes por semana por 10 semanas. Uma semana após a última injeção, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

Grupo BDL: Animais, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após diferentes intervalos de tempo, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

Figura 5

Sobrevida dos animais submetidos ao modelo experimental BDL



Legenda: animais, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após diferentes intervalos de tempo, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

1.2 Análise descritiva

As medidas descritivas (peso dos animais e do fígado) bem como a relação peso do fígado/peso do animal nos grupos experimentais de CCl₄ e soro de porco estão apresentadas na Tabela 2, onde podemos observar que não houve variabilidade entre os grupos.

O modelo experimental de BDL foi desenvolvido para melhor caracterização da expressão das proteínas relacionadas à fibrose. Realizamos experimentos em diferentes tempos conforme apresentado na Tabela 3. Com relação às medidas do peso dos animais selvagens e KOB₁ não tiveram variabilidade, apresentando sobreposição dos intervalos de confiança nos grupos experimentais, sugerindo que a média da amostra encontrada é representativa da população. Achados similares foram encontrados com relação aos pesos dos fígados dos animais selvagens e KOB₁ e os respectivos pesos relativos (Tabela 3).

Tabela 2

Peso dos animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas (a), dos respectivos fígados (b) e relação fígado/peso dos animais (c) após indução de fibrose por soro de porco ou CCl₄ (media ± epm)

a) Peso dos animais

Grupo experimental	n	Selvagem	n	Knockout
Soro de porco	7	31,2 ± 0,9	8	31,2 ± 0,6
Óleo	5	28,0 ± 1,2	5	27,9 ± 3,1
CCl ₄	13	31,3 ± 1,6	13	30,5 ± 0,8

b) Peso do fígado

Grupo experimental	n	Selvagem	n	Knockout
Soro de porco	7	1,8 ± 0,2	8	2,2 ± 0,2
Óleo	5	1,84 ± 0,14	5	1,48 ± 0,21
CCl ₄	13	1,87 ± 0,07	13	1,86 ± 0,07

c) Relação peso do fígado/peso do animal

Grupo experimental	n	Selvagem	N	Knockout
Soro de porco	7	5,9 ± 0,7	8	7,3 ± 0,8
Óleo	5	6,6 ± 0,2	5	5,4 ± 0,2
CCl ₄	13	6,2 ± 0,3	13	6,2 ± 0,2

Legenda:

Grupo soro de porco: Animais receberam injeção *ip* de 0,1 mL de soro de porco duas vezes por semana por 10 semanas. Uma semana após a última injeção, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

Grupo CCl₄: Camundongos receberam injeção *ip* de CCl₄ (1 mL CCl₄/Kg de peso) diluído (1:4) em veículo (óleo de milho), três vezes por semana no período de 6 semanas. O grupo controle recebeu o veículo. Após 1 semana, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

Tabela 3

Peso dos animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ (KOB₁) de cininas (a), dos respectivos fígados (b) e relação fígado/peso dos animais (c) após indução de fibrose por ligadura do ducto biliar (BDL) (média ± epm)

a) Peso do animal

	<i>Sham</i>				BDL			
	Selvagem		KOB ₁		Selvagem		KOB ₁	
	n		n		n		n	
Até 24hs	3	30,0 ± 0,7		---	8	31,4 ± 0,5		---
1-4 sem	8	27,3 ± 1,0		---	13	23,2 ± 0,9		---
6-8 sem	12	28,7 ± 0,6	4	28,0 ± 1,1	7	23,7 ± 0,5	5	27,6 ± 2,8

b) Peso do fígado

	<i>Sham</i>				BDL			
	Selvagem		KOB ₁		Selvagem		KOB ₁	
	n		n		n		n	
Até 24hs	3	1,5 ± 0,1		---	8	1,7 ± 0,0		---
1-4 sem	8	1,8 ± 0,1		---	13	1,9 ± 0,1		---
6-8 sem	12	1,6 ± 0,1	4	1,7 ± 0,1	7	2,4 ± 0,2	5	2,0 ± 0,1

c) Relação peso do fígado/peso do animal

	<i>Sham</i>				BDL			
	Selvagem		KOB ₁		Selvagem		KOB ₁	
	n		n		n		n	
Até 24hs	3	0,067 ± 0,033		---	8	0,088 ± 0,013		---
1-4 sem	8	0,065 ± 0,003		---	13	0,085 ± 0,004		---
6-8 sem	12	0,054 ± 0,002	4	0,063 ± 0,002	7	0,100 ± 0,009	5	0,078 ± 0,012

Legenda: Animais, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após diferentes intervalos de tempo, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados.

1.3 Características macroscópicas e histológicas

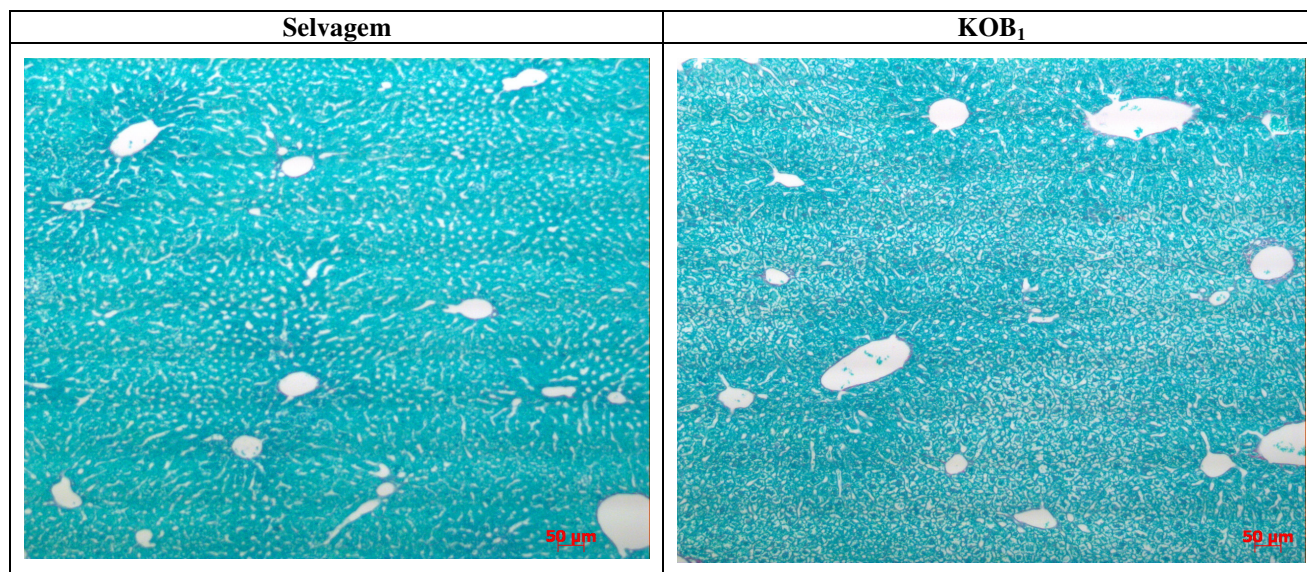
a) Grupos soro de porco e CCl₄

Nos animais selvagens e KOB₁ submetidos ao modelo experimental de fibrose por soro de porco podemos sugerir a presença de processo inflamatório, principalmente nos animais selvagens (Figura 5). Estes dados sugerem que a dose e/ou o tempo de injeção não foram suficientes para a indução de fibrose nos animais.

No modelo de fibrose experimental por CCl₄, tanto os animais selvagens quanto os KOB₁, observamos septos hexagonais interconectados com a veia central (Figura 6). Nos grupos controles, verificamos que óleo de milho não altera o padrão histológico hepático.

Figura 6

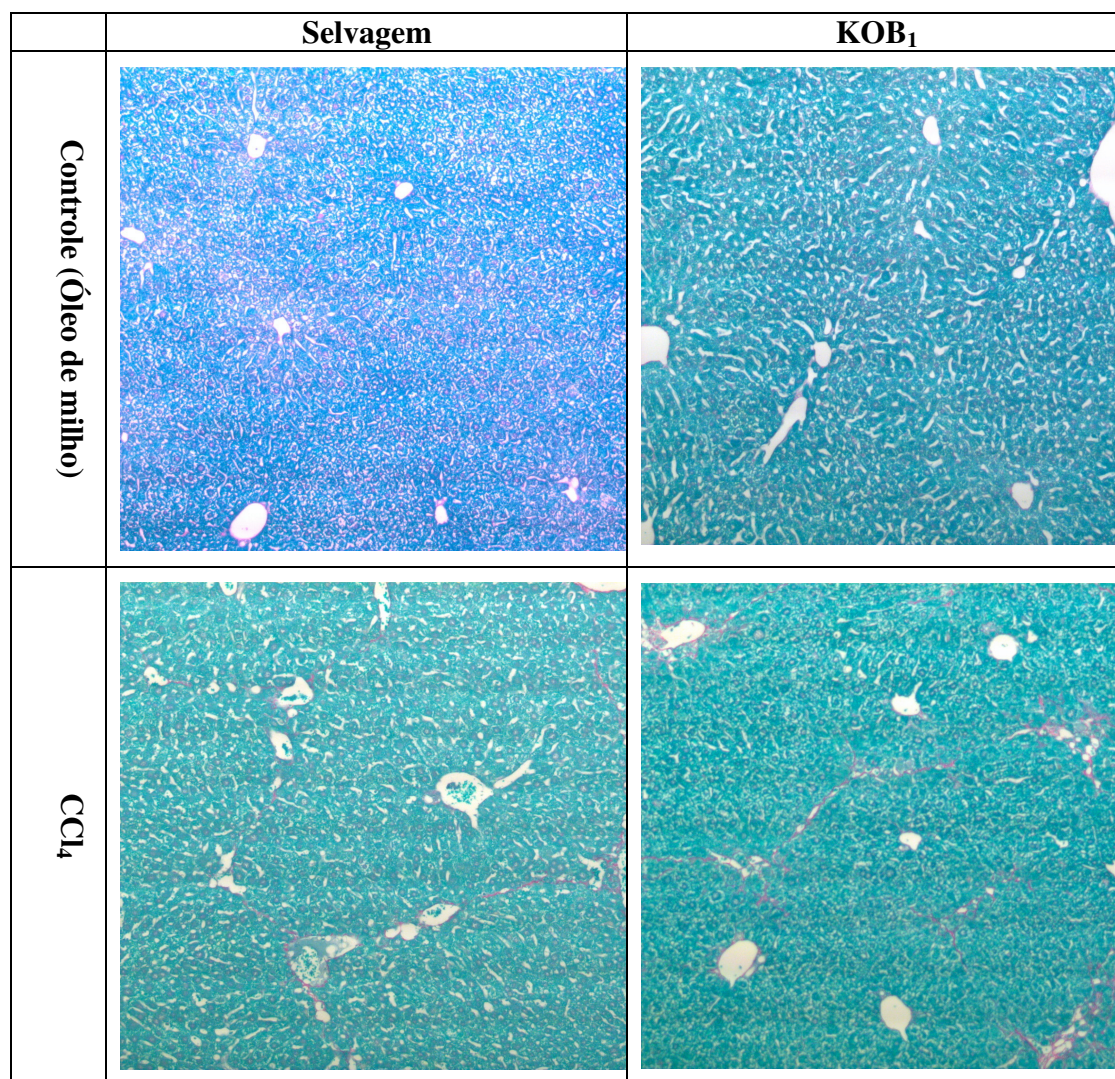
**Perfil histológico do fígado de animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ (KOB₁) de cininas após indução de fibrose por soro de porco.
(aumento de 100x)**



Legenda: Camundongos receberam injeção *ip* de 0,1 mL de soro de porco duas vezes por semana por 10 semanas. Uma semana após a última injeção, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius.

Figura 7

**Perfil histológico dos fígados de animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ (KOB₁) de cininas após indução de fibrose por CCl₄.
(aumento de 100x)**



Legenda: Camundongos receberam injeção *ip* de CCl₄ (1 mL CCl₄/Kg de peso) diluído (1:4) em óleo de milho, três vezes por semana no período de 6 semanas. O grupo controle recebeu o mesmo volume de óleo de milho. Após 1 semana, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius.

b) Grupo BDL

Até 24 horas, todos os animais selvagens não apresentaram nenhum sinal macroscópico relacionado à cirrose apenas aumento do tamanho da vesícula biliar. Nos animais a partir de uma semana de indução da fibrose já observamos sinais clássicos de cirrose tais como: icterícia, ascite, emagrecimento, colúria e presença de cálculos na vesícula biliar (Figura 7).

Na Figura 8, podemos acompanhar as alterações histológicas nos fígados dos animais selvagens em uma hora a oito semanas após BDL. Observamos na análise histológica dos fígados de animais selvagens antes de 24 horas, ausência de fibrose, porém, a partir de 24 horas encontramos o início da formação de septos fibróticos com aparecimento de fibrose portal, indicando estágio 1. Com uma semana de indução, os fígados apresentam estágio 2, com surgimento de fibrose periportal e perisinusoidal, intensificado a partir de duas a quatro semanas, onde encontramos a formação de pontes de fibrose (estágio 3) e com oito semanas, o animal já havia desenvolvido cirrose (estágio 4).

O grau de fibrose foi determinado pela escala de cinco pontos (Brunt *et al.*, 2000; Kleiner *et al.*, 2005) e está apresentada na Tabela 4. Sendo, 0 – ausência de fibrose; 1 – portal / perisinusoidal; 2 – perisinusoidal e portal/periportal; 3 – septal ou pontes de fibrose e 4 – presença de cirrose.

Quando comparamos os fígados dos animais selvagens e KOB₁ após 8 semanas de BDL (Figura 9) podemos verificar que os selvagens apresentaram fibrose numa estágio mais avançado (nível 4) do que nos animais KOB₁ (nível 3). Os animais controle (*sham*) não apresentaram alteração histológica importante após o mesmo período de cirurgia.

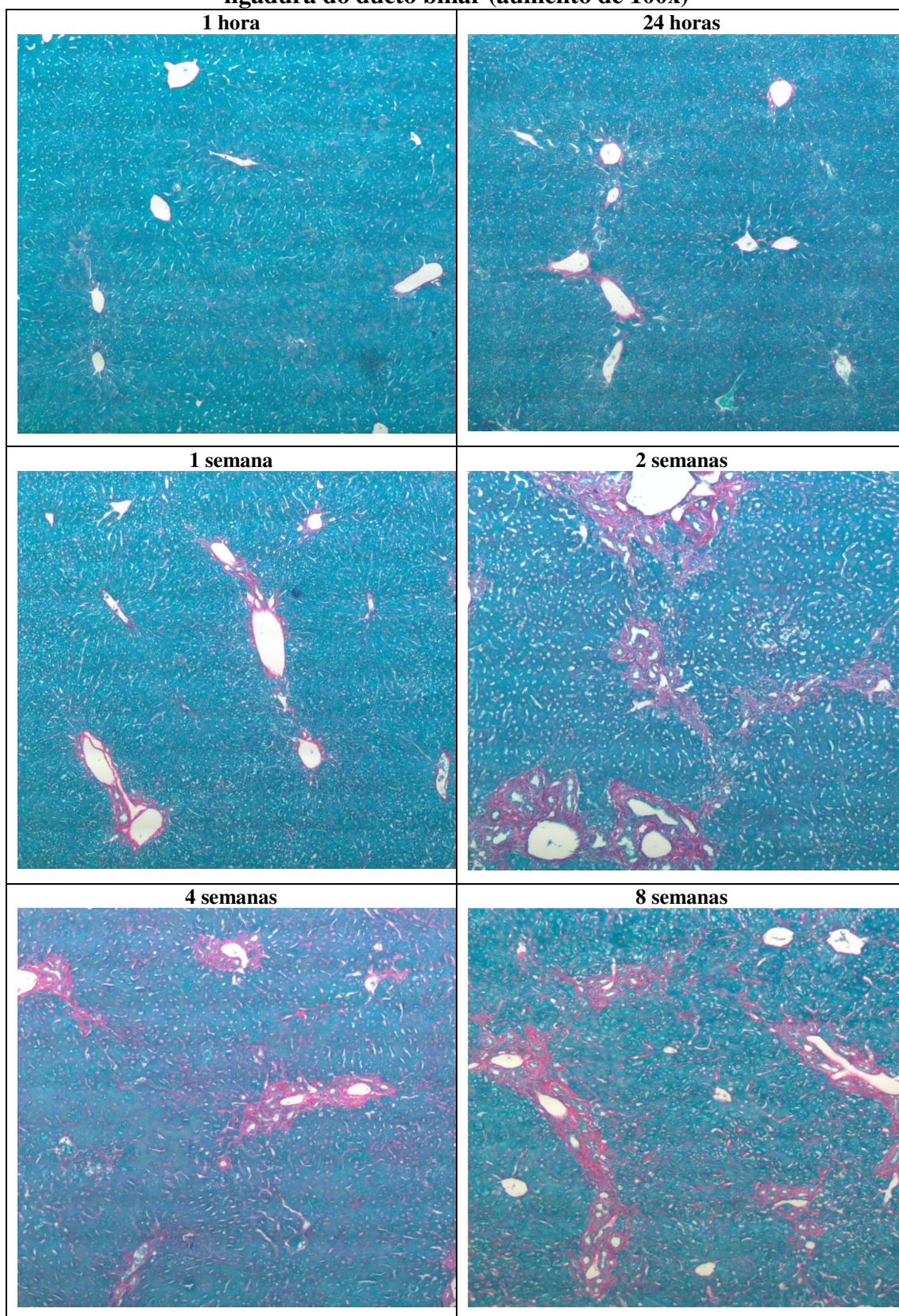
Figura 8

Aspecto macroscópico do animal selvagem submetido ao modelo de ligadura do ducto biliar após 1 semana



Legenda: Camundongos, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após o tempo pré-determinado de 30 minutos a 8 semanas, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius.

Figura 9
Perfil histológico do fígado dos animais selvagens em diferentes tempos após ligadura do ducto biliar (aumento de 100x)



Legenda: Camundongos, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após diferentes intervalos de tempo, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius.

Tabela 4

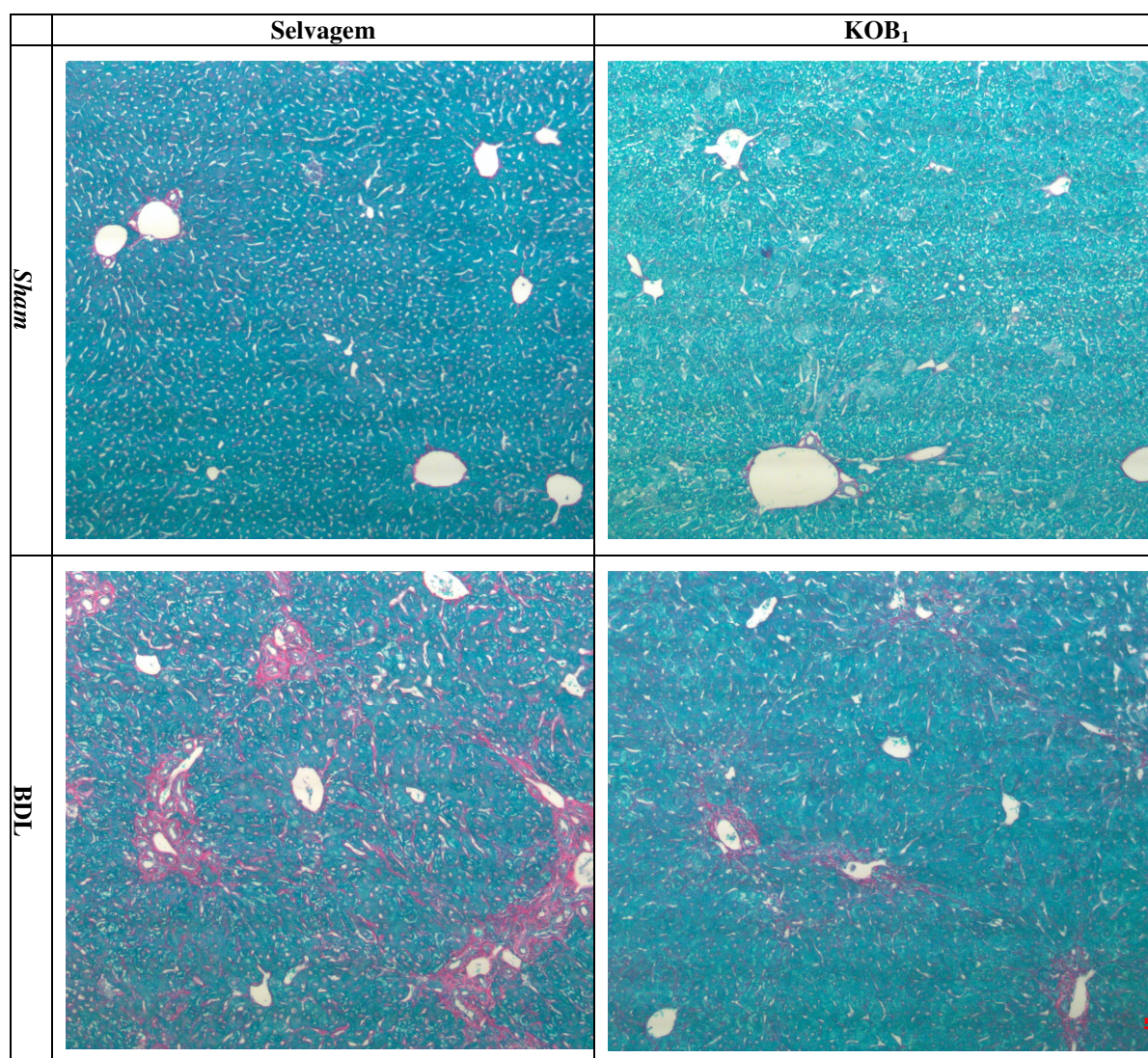
Escore de fibrose em animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas submetidos ao modelo de ligadura do ducto biliar em função do tempo de indução

	Sham				BDL			
	Selvagem		KOB ₁		Selvagem		KOB ₁	
	n	Escore	n	Escore	n	Escore	n	Escore
30 min	1	0	-	-	1	0	-	-
1h	-	-	-	-	1	0	-	-
2h	-	-	-	-	1	0	-	-
3h	-	-	-	-	1	0	-	-
4h	-	-	-	-	1	0	-	-
5h	1	0	-	-	1	0	1	0
10h	-	-	-	-	1	0	-	-
24h	1	0	-	-	1	1	-	-
1 sem	-	-	-	-	5	2	1	1
2 sem	4	0	-	-	4	3	-	-
4 sem	4	0	-	-	4	3	-	-
6 sem	4	0	-	-	1	3	-	-
8 sem	8	0	4	0	6	4	5	3

Legenda: Animais, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Após diferentes intervalos de tempo, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius. Escore foi realizado segundo Brunt *et al.*, 2000; Kleiner *et al.*, 2005

Figura 10

Perfil histológico dos fígados de animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas submetidos ao modelo experimental de ligadura do ducto biliar ao final de 8 semanas (aumento de 100x)



Legenda: Camundongos, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos à laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Os animais do grupo *sham* passaram pelo mesmo procedimento, porém, não tiveram seu ducto biliar ligado e seccionado. Após 8 semanas, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius.

2. Morfometria

Para melhor caracterizar o perfil histológico observado nos diferentes grupos utilizados neste trabalho, realizamos a análise morfométrica quantificando o conteúdo de colágeno e parênquima hepático.

No grupo soro de porco o conteúdo de parênquima nos animais selvagem ($82,2 \pm 1,5$; $n=7$) e KOB₁ ($85,4 \pm 1,8$; $n=7$) não apresentou diferença estatisticamente significativa (teste-t $p= 0,129$) (Figura 10A). O conteúdo de colágeno quantificado no fígado dos animais selvagens ($0,29 \pm 0,15$; $n=7$) foi semelhante ao dos animais KOB₁ ($0,26 \pm 0,05$; $n=7$) (Figura 10B).

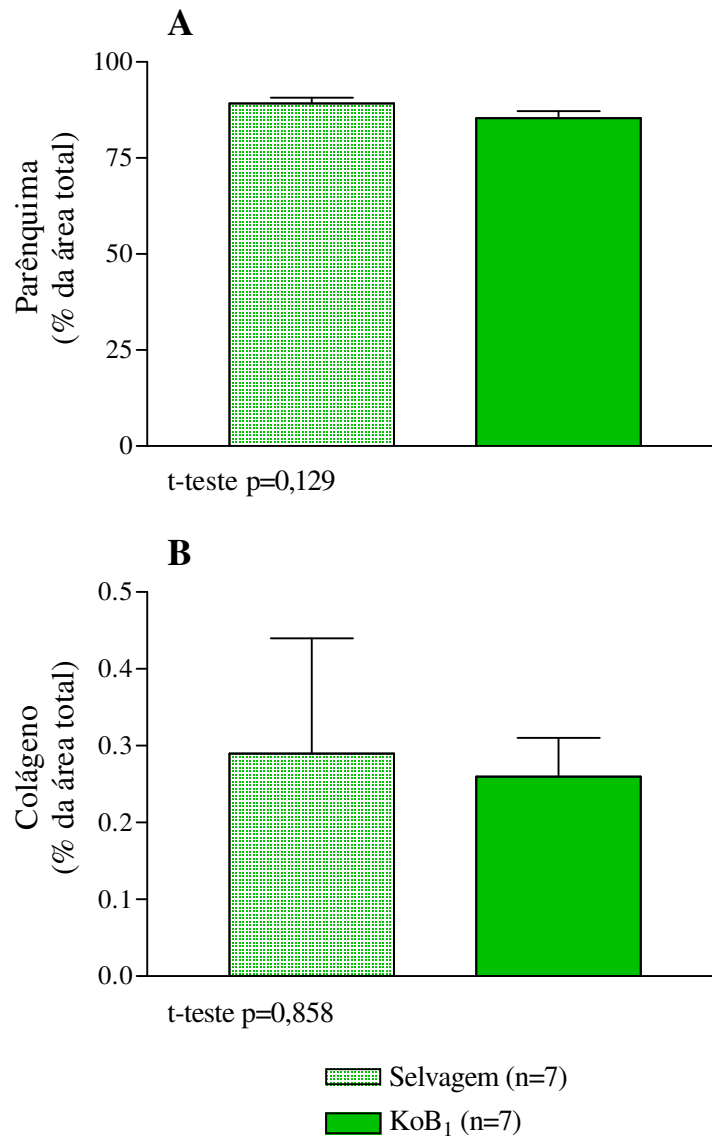
Na Figura 11A podemos observar que os animais KOB₁ tratados com CCl₄ apresentaram significativamente menor conteúdo de parênquima ($83,0 \pm 1,5$; $n=12$) quando comparado com seu respectivo controle (óleo - KOB₁) ($91,6 \pm 1,4$; $n=5$). Animais selvagens tratados com óleo ($87,4 \pm 1,2$; $n=4$) ou CCl₄ ($86,3 \pm 4,7$; $n=10$) não apresentaram diferenças.

Em relação ao conteúdo de colágeno neste modelo experimental nós verificamos que CCl₄ foi capaz de induzir fibrose nos dois tipos de animais já que o conteúdo de colágeno tanto nos animais selvagens ($1,1 \pm 0,2$; $n=10$) quanto nos KOB₁ ($1,6 \pm 0,3$; $n=12$) foi maior que os respectivos controles ($0,3 \pm 0,1$, $n=4$ selvagem; $0,4 \pm 0,2$, $n=5$ KOB₁) (Figura 11B).

Na Figura 12A podemos observar o conteúdo de parênquima nos animais selvagens e KOB₁ submetidos ao modelo BDL. O fígado dos animais selvagens submetidos ao BDL apresentou conteúdo de parênquima ($82,1 \pm 3,3$; $n=6$) significativamente menor (teste t $p=0,008$) que nos respectivos controles *sham* ($92,2 \pm 1,3$; $n=8$). Nos animais KOB₁ não houve diferença entre os grupos *sham* ($95,0 \pm 1,6$; $n=4$) e BDL ($91,6 \pm 2,2$; $n=5$). Como podemos observar os animais KOB₁ submetidos ao BDL apresentaram significativo (teste t $p=0,048$) conteúdo de colágeno que os animais selvagens.

Figura 11

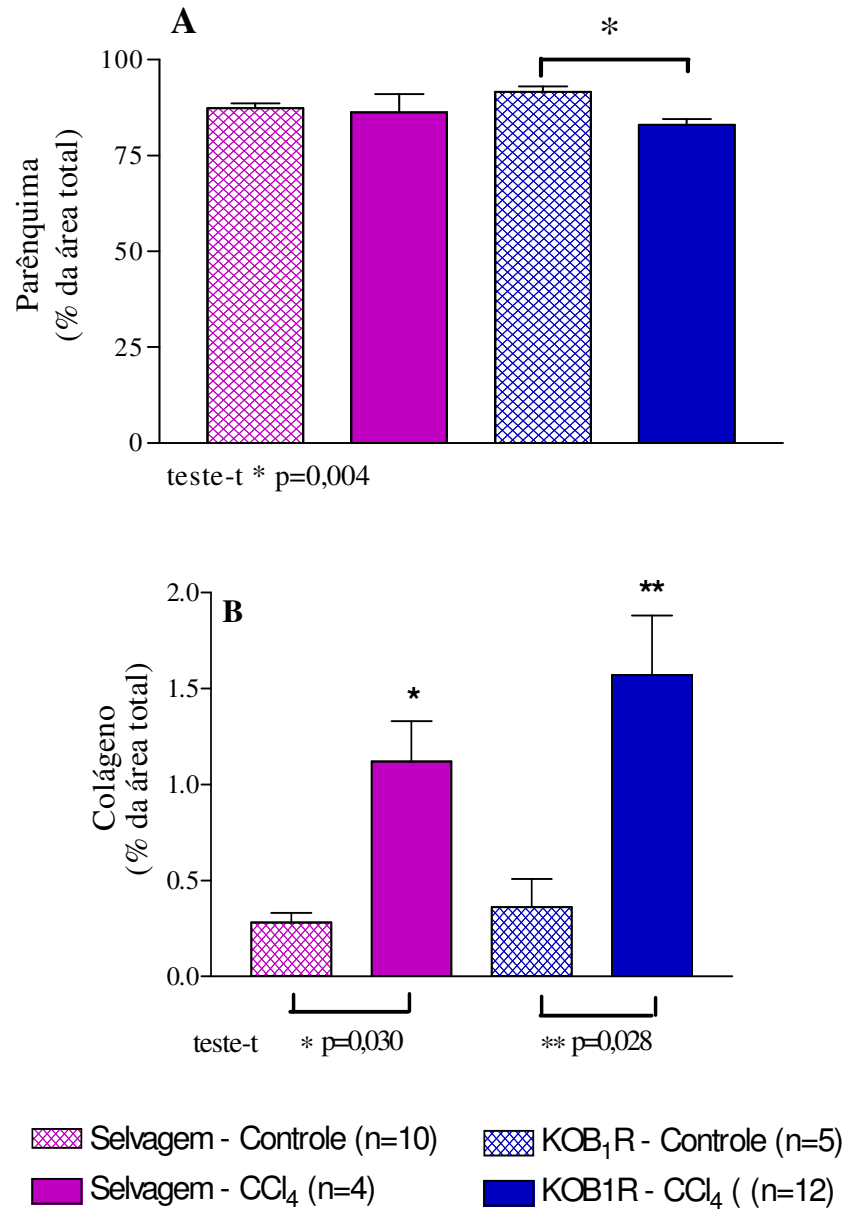
Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e knockout de receptor B₁ de cininas (KOB₁) após indução de fibrose por soro de porco (média ± epm)



Legenda: Camundongos receberam injeção *ip* de 0,1 mL de soro de porco duas vezes por semana por 10 semanas. Uma semana após a última injeção, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius. Foram digitalizados cinco campos microscópicos aleatórios de cada corte histológico com aumento de 100 vezes. As imagens foram processadas e quantificadas utilizando o programa Axiovision (Zeiss).

Figura 12

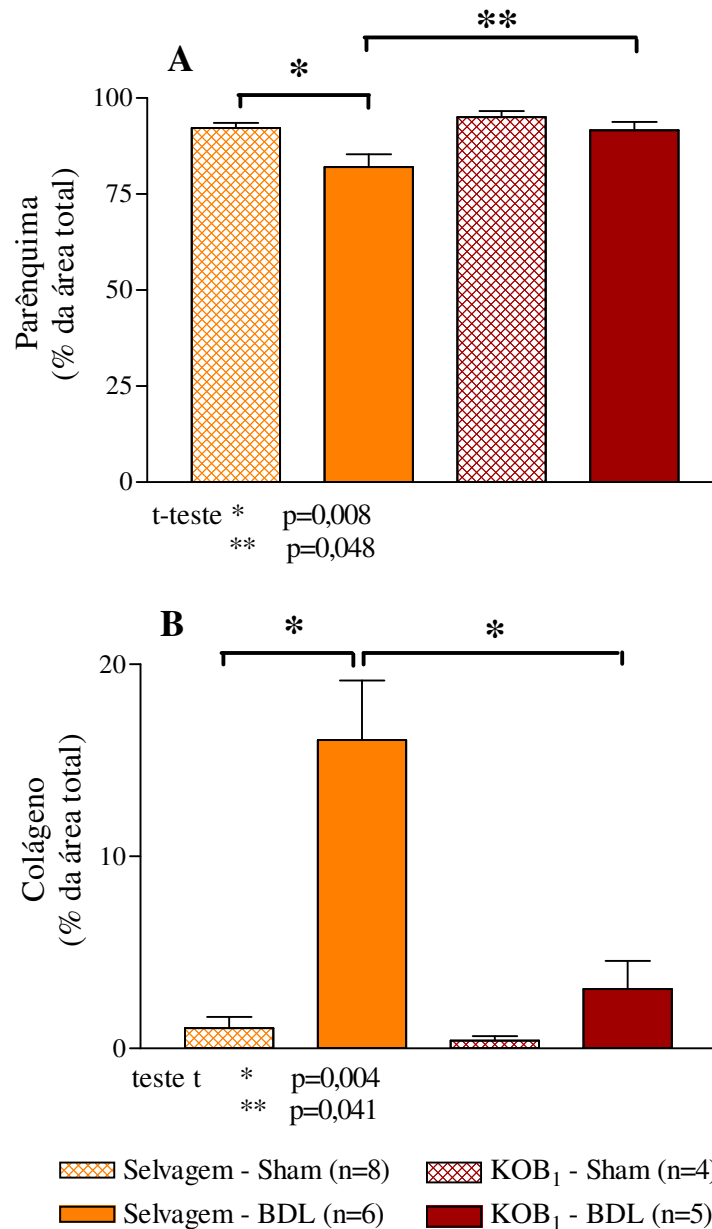
Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas (KOB₁) após indução de fibrose por CCl₄ (média ± epm)



Legenda: Camundongos receberam injeção *ip* de CCl₄ (1 mL CCl₄/Kg de peso) diluído (1:4) em veículo (óleo de milho), três vezes por semana no período de 6 semanas. O grupo controle recebeu o veículo. Uma semana após a última injeção, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius. Foram digitalizados cinco campos microscópicos aleatórios de cada corte histológico com aumento de 100 vezes. As imagens foram processadas e quantificadas utilizando o programa Axiovision (Zeiss).

Figura 13

Conteúdo de parênquima (A) e colágeno (B) do fígado dos animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas após 8 semanas de ligadura do ducto biliar (média ± epm)



Legenda: Camundongos, sob anestesia inalatória com isoflurano, foram submetidos a laparotomia, e o ducto biliar ligado e seccionado. Os animais do grupo *sham* passaram pelo mesmo procedimento, porém, não tiveram seu ducto biliar ligado e seccionado. Após 8 semanas, os fígados foram perfundidos e retirados, pesados e processados. Cortes de fígados foram fixados em paraformaldeído/PBS e corados com picrus-sirius. Foram digitalizados cinco campos microscópicos aleatórios de cada corte histológico com aumento de 100 vezes. As imagens foram processadas e quantificadas utilizando o programa Axiovision (Zeiss).

Em relação ao conteúdo de colágeno (Figura 12B) verificamos que o fígado dos animais selvagens apresentaram maior conteúdo de colágeno no grupo BDL ($16,1 \pm 3,1$; $n=6$) que nos respectivos controles *sham* ($1,1 \pm 0,6$; $n=8$). Interessantemente fígado de animais KOB₁ submetidos ao BDL apresentou conteúdo de colágeno ($3,1 \pm 1,4$; $n=5$) menor que nos animais selvagens submetidos ao mesmo procedimento ($16,1 \pm 3,1$; $n=6$).

3. Expressão de marcadores de fibrogênese

3.1 KLF-6

A Figura 13 mostra o padrão de *blotting* para KLF-6 nas amostras de fígado dos diferentes grupos. Pudemos observar que os animais KOB₁ apresentaram forte marcação em relação aos selvagens submetidos aos modelos de fibrose por CCl₄ ou soro de porco (Figura 13a). Nos animais selvagens submetidos à BDL verificamos marcação relativa à KLF-6 de intensidade crescente em função do tempo de indução (Figura 13b). A expressão de KLF-6 não foi estudada nos animais KOB₁.

A tabela 5 resume os resultados encontrados da expressão de KLF-6 nos grupos experimentais de CCl₄, soro de porco ou BDL.

Figura 14

Perfil representativo do *blotting* para KLF-6 no homogenato de fígado de animais selvagens e/ou *knockout* de receptor B₁ de cininas (KOB₁) após indução de fibrose por CCl₄, soro de porco ou ligadura do ducto biliar (BDL)

a) grupos CCl₄ e soro de porco



b) grupo BDL-animais selvagens

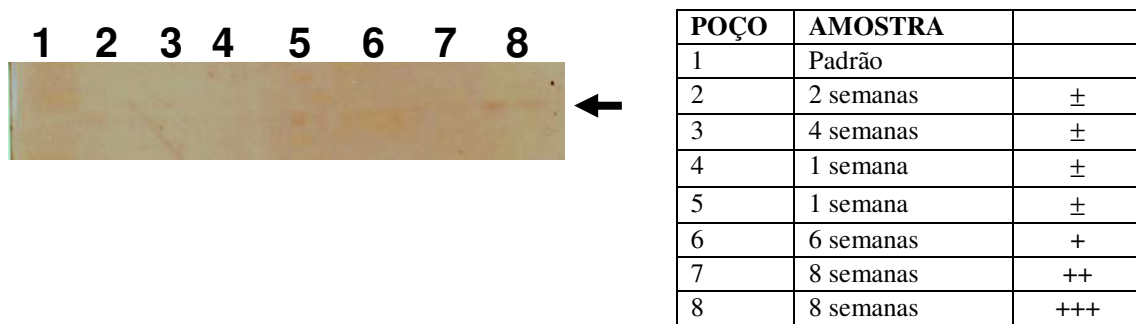


Tabela 5

Padrão de expressão do KLF-6 no fígado de animais selvagens e *knockout* de receptor B₁ de cininas (KOB₁) após indução de fibrose por CCl₄, soro de porco ou ligadura do ducto biliar (BDL)

KLF-6	Selvagem	KOB₁
CCl₄	± (a)	+
Soro de porco	-	+
BDL	+	NR

Legenda: a: apenas um animal apresentou uma fraca banda positiva; NR: não realizado.

3.2 HSP 47

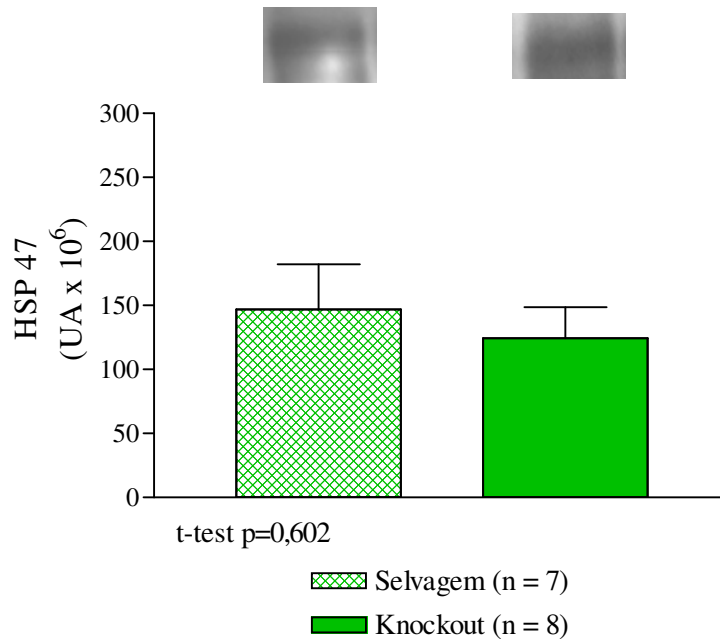
Não houve diferença estatisticamente significativa (t-test $p=0,602$) na expressão de HSP 47 no fígado dos animais selvagens ($146,8 \pm 35,4 \times 10^6$ UA; $n=7$) e KOB₁ ($124,3 \pm 24,3 \times 10^6$ UA; $n=8$) tratados com soro de porco (Figura 14).

A Figura 15 apresenta o perfil do blotting para a proteína HSP 47 e sua quantificação no grupo CCl₄. Nós podemos observar que houve aumento (teste t $p=$ da expressão de HSP 47 no fígado dos animais KOB₁ tratados com CCl₄ ($104,1 \pm 15,2 \times 10^6$ UA; $n=13$) quando comparado com o fígado dos animais selvagens ($61,1 \pm 13,1 \times 10^6$ UA; $n=13$). Surpreendentemente o fígado dos animais tratados com óleo (controle) apresentou expressão de HSP 47 aumentada tanto nos animais selvagens ($72,9 \pm 25,2 \times 10^6$ UA; $n=5$) quanto nos animais KOB₁ ($166,7 \pm 39,4 \times 10^6$ UA; $n=5$).

Em relação ao modelo experimental de BDL, verificamos que a expressão de HSP 47 no fígado dos animais selvagens ($23,5 \times 10^6$ UA; $n=1$) e KOB₁ ($14,0 \pm 5,4 \times 10^6$ UA; $n=2$) no grupo *sham* (controle) não apresentou diferença e foi relativamente baixa (Figura 16). No grupo BDL, a expressão de HSP 47 no fígado dos animais KOB₁ ($247,1 \pm 12,8 \times 10^6$ UA; $n=2$) foi maior que nos animais selvagens submetidos a BDL ($137,5 \pm 25,5 \times 10^6$ UA; $n=4$).

Figura 15

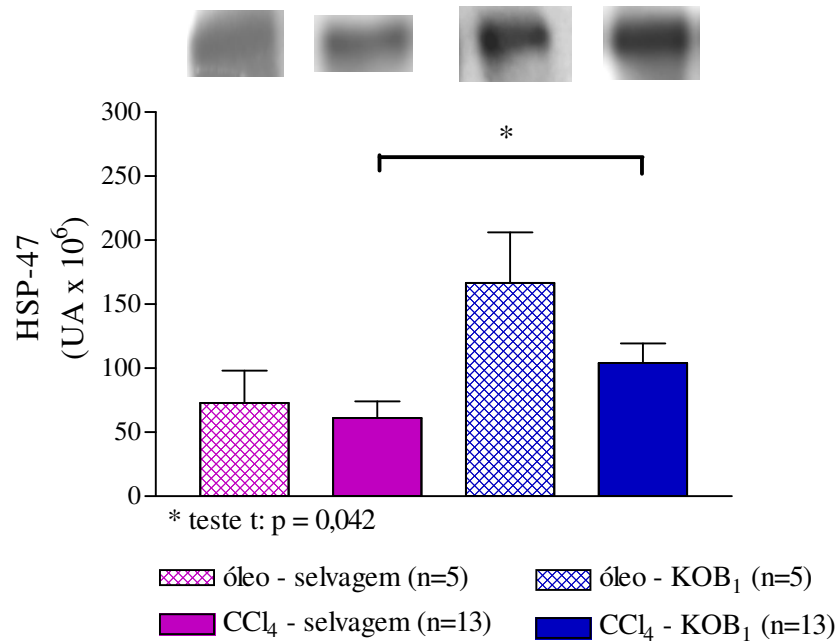
Perfil representativo do *blotting* e quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de soro de porco



Legenda: Proteínas (10 µg) do homogenato de fígado dos animais submetidos ao modelo de fibrose experimental por soro de porco foram separadas em SDS-PAGE (5-12%) e transferidas para membrana PVDF onde foi realizado o *Western Blotting* utilizando anticorpo específico anti-HSP 47 e secundário associado a peroxidase. A revelação foi realizada por quimiluminescência (ECL). As bandas visíveis foram fotografadas e quantificadas pelo aparelho LAS-3000.

Figura 16

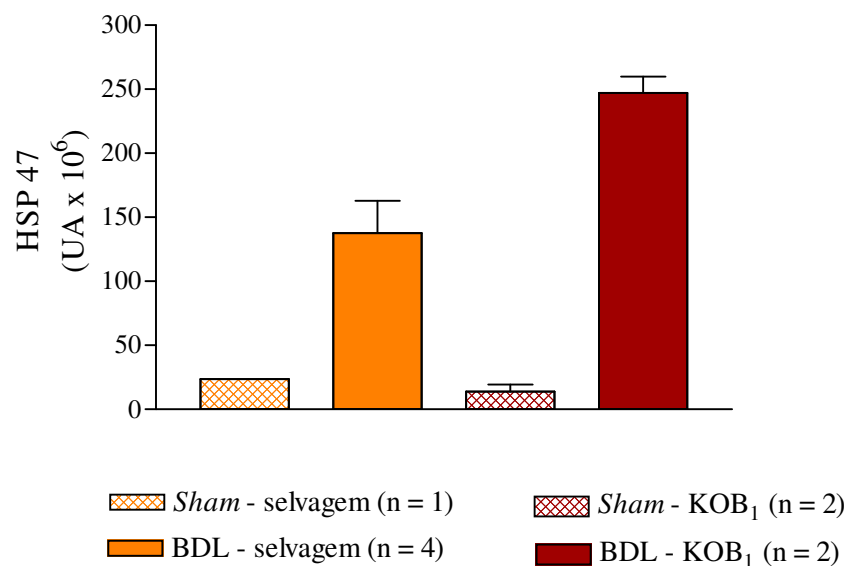
Perfil representativo do *blotting* e quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de CCl₄



Legenda: Proteínas (10 µg) do homogenato de fígado dos animais submetidos ao modelo de fibrose experimental por CCl₄ foram separadas em SDS-PAGE (5-12%) e transferidas para membrana PVDF onde foi realizado o *Western Blotting* utilizando anticorpo específico anti-HSP 47 e secundário associado a peroxidase. A revelação foi realizada por quimiluminescência (ECL). As bandas visíveis foram fotografadas e quantificadas pelo aparelho LAS-3000.

Figura 17

Quantificação da expressão de HSP 47 no homogenato de fígado de animais submetidos ao modelo experimental de ligadura do ducto biliar



Legenda: Proteínas (10 µg) do homogenato de fígado dos animais submetidos ao modelo de fibrose experimental por BDL foram separadas em SDS-PAGE (5-12%) e transferidas para membrana PVDF onde foi realizado o *Western Blotting* utilizando anticorpo específico anti-HSP 47 e secundário associado a peroxidase. A revelação foi realizada por quimiluminescência (ECL). As bandas visíveis foram fotografadas e quantificadas pelo aparelho LAS-3000.

DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o papel do receptor B₁ de cininas na fibrogênese hepática. A avaliação da fibrogênese foi realizada por análise morfométrica bem como a expressão de duas proteínas importantes do processo, KLF-6 e HSP 47, em camundongos selvagens e *knockout* de receptor B₁ (KOB₁) de cininas submetidos a 3 modelos experimentais diferentes.

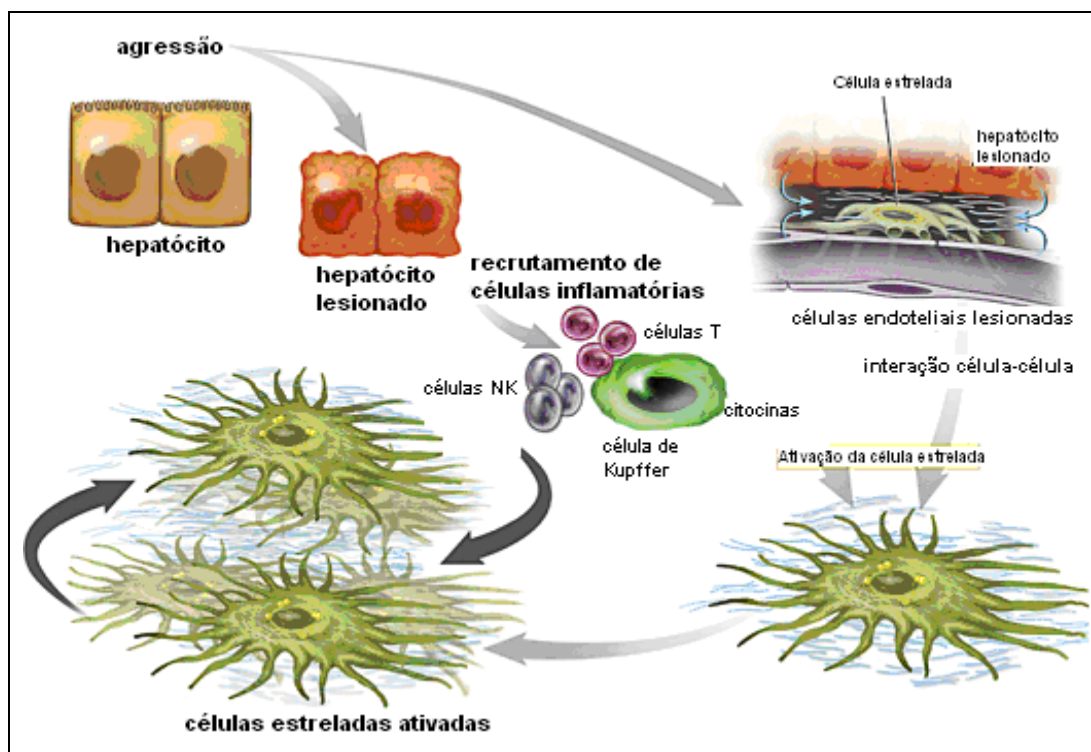
Fibrose é resposta do fígado a agressão e envolve vários tipos celulares e mediadores para proteger o órgão da lesão (Figura 17) (Rockey & Bissel, 2006). Embora lesões agudas ativem mecanismos de fibrogênese, doenças hepáticas crônicas decorrentes de infecção, drogas, doenças metabólicas ou resposta imune são necessárias para manutenção da fibrose. Em humanos, fibrose pode eventualmente progredir rapidamente de semanas a meses, mas em geral evolui em décadas.

Para melhor compreensão da fibrose e cirrose hepática, modelos animais são desenvolvidos e utilizados com o propósito de melhor entender a gênese e o desenvolvimento da fibrose e assim tratá-la ou impedi-la. A manutenção da arquitetura hepática nos modelos animais favorece o estudo do conjunto de respostas envolvidas na fibrogênese, mas também torna ainda mais complexa a compreensão deste evento.

Modelos *in vitro* para o estudo das respostas encontradas em células estreladas também foram desenvolvidos e têm contribuído significativamente para o entendimento de sua biologia e da fibrogênese, mas não refletem completamente a complexidade da arquitetura celular *in vivo* (Pinzani & Marra, 2005; Van de Bovenkamp *et al.*, 2005).

Figura 18

Participação dos diferentes tipos celulares na cascata fibrogênica



(Rockey & Bissell, 2006)

Neste trabalho, utilizamos 3 modelos experimentais de fibrose com etiologias diferentes: indução química por CCl₄, imunológica por soro de porco e colestática por ligadura de ducto biliar (BDL) (Pinzani & Marra, 2005). Camundongos KOB₁ foram utilizados para a compreensão do papel do receptor na fibrogênese em função de resultados anteriores onde verificamos maior expressão do receptor em modelo experimental de fibrose em ratos (Nagaoka *et al.*, 2006). Sancho-Bru *et al.* (2007) demonstrou que o receptor B₁ (B₁R) é encontrado tanto em fígados humanos normais quanto em fibróticos, tendo maior expressão nos últimos, corroborando nossos resultados.

Como o objetivo do trabalho foi o processo de fibrogênese hepática e não o estágio final (cirrose) 6 semanas de indução foi o tempo máximo já que estudos mostram que o desenvolvimento de cirrose por CCl₄ ocorre a partir de 2 ou mais meses de injeção (Song *et al.*, 2007; Tamayo, 1983).

A análise histológica do fígado dos animais submetidos ao modelo de CCl₄ revelou o aparecimento de septos de colágeno tanto em animais selvagens quanto nos KOB₁, confirmando a presença de fibrose. Verificamos através da análise morfométrica dos fígados que os animais selvagens e KOB₁ apresentaram quantidade de colágeno semelhante, sugerindo que os animais KOB₁ respondem igualmente ao estímulo por CCl₄ como os animais selvagens.

Outro modelo utilizado nesse trabalho foi de fibrose induzida por soro de porco. Repetidas injeções *ip* com soro de porco por um período prolongado causam fibrose hepática sem reconhecimento de dano hepatocelular. Esse modelo de fibrose experimental é bastante utilizado para estudar a formação de septos fibróticos ao nível celular e as mudanças estruturais que acompanham a fibrose como capilarização e venularização (Bhunchet & Fujieda, 1993; Bhunchet & Wake, 1998).

Pela análise histológica verificamos que o grupo soro de porco não desenvolveu fibrose tanto nos animais selvagens como nos KOB₁, evidenciado pela ausência de

septos fibróticos. No entanto, observamos a presença de processo inflamatório e/ou alteração no aspecto das células parenquimais com fibrose perisinusoidal e/ou portal. Pela análise morfométrica confirmamos a ausência de fibrose no grupo soro de porco já que tanto animais selvagens como KOB₁ apresentaram quantidades semelhantes de colágeno e nenhuma alteração também no conteúdo de parênquima. Provavelmente o tempo de indução e/ou dose utilizada não foram suficientes para a indução de fibrose, mas utilizamos este grupo para avaliar o início da fibrose no estágio de inflamação pré-fibrose.

No estudo onde ratos receberam injeções intraperitoneais de soro de porco, 3 vezes por semana, durante 16 semanas, a análise histológica revelou alterações hemodinâmicas na circulação intra-hepática, induzindo necrose/apoptose hepatocelular (Shiga *et al.*, 1997). No mesmo estudo, os testes bioquímicos apresentaram apenas a elevação na concentração de globulinas, porém, nenhuma alteração foi encontrada com relação à atividade das enzimas ALT, AST e ALP (Shiga *et al.*, 1997).

O modelo BDL é amplamente utilizado para indução de fibrose e cirrose. Pesquisadores relatam que depois do procedimento cirúrgico, ratos apresentam indícios de fibrose a partir de 12 dias, sendo que a partir de 4 a 8 semanas a cirrose hepática está presente em quase todos os animais (Chang *et al.*, 2005). Realizamos experimentos com tempos iniciais (30 minutos) e o tempo máximo descrito de 8 semanas e verificamos pela análise histológica aumento progressivo da cirrose nos animais selvagens, indicando que o modelo experimental foi realizado com sucesso.

De acordo com a quantidade de colágeno encontrada no fígado dos animais, verificamos que os animais selvagens, independente de serem do grupo *sham* ou BDL apresentaram maior quantidade de colágeno que o fígado dos animais KOB₁. Esses dados sugerem que no modelo BDL, a ausência do receptor de B₁ de cininas modula o fígado do desenvolvimento de fibrose por colestase.

Para melhor avaliarmos a fibrogênese nestes modelos experimentais, analisamos a expressão da proteína KLF-6 e HSP 47 por *Western blotting*.

O fator de transcrição KLF-6, previamente referido como um Zf9, localizado em núcleo e zonas perinucleares é expresso rapidamente após ativação de células estreladas *in vivo*, mas não em células quiescentes (Ratzu *et al.*, 1998; Lang *et al.*, 2000). Em estudos *in vitro* com células estreladas isoladas revelou a expressão de KLF-6 após 3 horas da administração de CCl₄, sendo essa expressão observada até 24 horas (Ratzu *et al.*, 1998; Van de Bovenkamp M *et al.*, 2005). Nós verificamos que KLF-6 é expressa pelo fígado de animais KOB₁ que receberam por seis semanas CCl₄, demonstrando manutenção da expressão no órgão inteiro. Nos animais tratados com soro de porco e sem desenvolvimento de fibrose, nós também verificamos a expressão de KLF-6 porém somente nos animais KOB₁. No grupo BDL, observamos que o aumento da expressão da proteína KLF-6 foi presente em camundongos selvagens após 10 a 24 horas de ligação do ducto biliar, sendo mais significativo após 8 semanas. Assim, podemos observar que a expressão da KLF-6 foi presente mesmo em fígados que não desenvolveram fibrose (grupo soro de porco). Estes dados sugerem papel inibitório do receptor B₁ na expressão de KLF-6.

Em relação à expressão de HSP 47, esta proteína está diretamente relacionada com a produção de colágeno, principalmente nas células estreladas (Friedmann, 2008b). Recentemente, Sato *et al* (2008) demonstraram forte reversão da fibrose experimental por CCl₄, DMN ou BDL utilizando lipossomo contendo *siRNA* contra HSP 47 acoplado a vitamina A como sistema de entrega de drogas/ferramentas anti-fibrose às células estreladas (Figura 18).

Nós verificamos que nos modelos experimentais que resultaram em fibrose comprovada histológica e morfometricamente, isto é, grupo CCl₄ e BDL, o fígado dos animais KOB₁ apresentou maior expressão de HSP 47 que o fígado dos animais

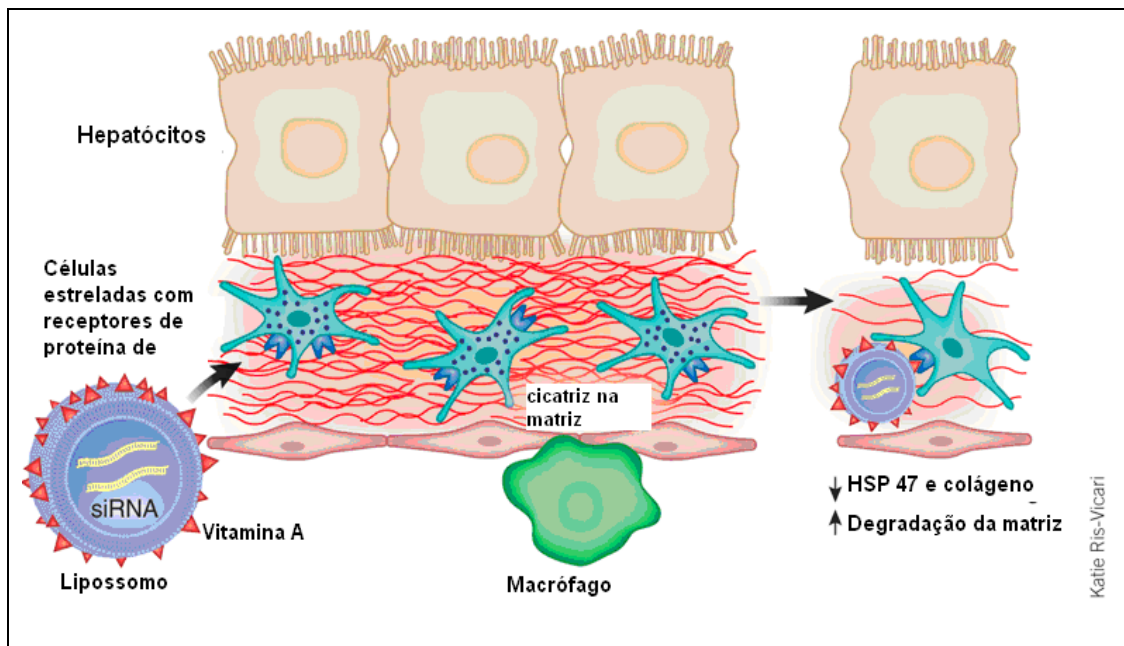
selvagens. Song et al. (2007) também verificou aumento da expressão de HSP 47 em fígado de camundongos *knockout* de HSP 70 tratados com CCl₄.

Nos grupos onde houve uma maior prevalência de inflamação como no grupo controle com óleo e o de soro de porco, fígados também expressaram HSP 47. Interessante, no grupo controle que recebeu óleo de milho, a análise histológica do fígado comprovou a ausência de fibrose, no entanto observamos expressão de HSP 47 no fígado dos animais selvagens e KOB₁, sendo maior no último. Nos animais do grupo soro de porco também observamos forte expressão de HSP 47 no fígado tanto de animais selvagens quanto nos KOB₁.

Estes dados nos levaram a hipotetizar que HSP 47 não poderia ser utilizada como marcador de fibrogênese visto que sempre apresentava aumentada em fígados de animais KOB₁. Entretanto, no modelo de BDL, o fígado dos animais controle (*sham*) selvagens e KOB₁ apresentaram quantidade inexpressiva de HSP 47 em comparação com os demais grupos. Assim, todos os dados juntos sugerem que a expressão de HSP 47 esteja de fato relacionada com a produção de colágeno induzida na fibrose, mas também presente no início de processo inflamatório conforme observado no grupo controle óleo. No caso do grupo soro de porco, além do processo inflamatório, início do desenvolvimento de fibrose poderia estar ocorrendo apesar de ainda não termos a observação dos sinais clássicos como a presença dos septos fibrosos, i.e., a formação de colágeno poderia estar numa fase inicial.

Figura 19

Entrega de lipossomo acoplado a vitamina A às células estreladas



(Friedmann, 2008b)

A relação da HSP 47 com processo inflamatório pode ser melhor explorada utilizando o grupo controle tratado apenas com óleo como modelo experimental. De fato, foi verificado que óleo de milho pode aumentar processo de peroxidação lipídica, mas não inflamação nem fibrose induzidos por CCl₄ (Fang & Lin, 2008). Não há dados na literatura sobre o efeito do óleo no fígado, mas nossos dados mostram algum efeito pelo aumento da expressão de HSP 47 pelo fígado dos animais tratados apenas com óleo. Estes dados serão melhor investigados.

Durante a ativação de células estreladas *in situ*, temos o aumento da expressão de TGF- β (Nakatsukasa *et al.*, 1990), receptores para fator de crescimento derivado de plaquetas (Wong *et al.*, 1994), a isoforma músculo específica de α -actina (Rockey *et al.*, 1992) e moléculas de adesão celular (Knittel *et al.*, 1996).

Clarke et al (1993) demonstraram que a expressão de HSP 47 e de procolágeno são co-regulados em células da linhagem mioblástica. Masuda et al (1994) elucidou a relação da expressão de HSP 47 com a biossíntese de colágeno e verificou que esta expressão não está relacionada com a administração direta de CCl₄, já que apresenta expressão após 3 dias de administração.

A participação do TGF- β no processo de fibrogênese é importante, pois aumenta a síntese de α -actina e colágeno *in vivo* e *in vitro* (Border & Noble, 1994). Entretanto foi demonstrado que a resposta ao TGF- β é diferente em cultura de células estreladas e miofibroblastos (Dooley *et al.*, 2000).

Estudo em camundongos *knockout* de receptores de fator de necrose tumoral (TNF- α) que receberam injeções de CCl₄ apresentou significativa diminuição da fibrose comprovada por menor deposição de colágeno bem como expressão de TGF- β (Simeonova *et al.*, 2001).

A relação direta entre estes mediadores (TNF- α e TGF- β) e HSP 47 não é descrita na literatura embora pareça existir já que tem em comum o aumento da expressão das mesmas e conseqüente aumento da síntese de colágeno. De forma

interessante, nós verificamos aumento da expressão de HSP 47 no fígado dos animais tratados com óleo (controle grupo CCL₄) independente da presença de fibrose comprovada histologicamente. Nos animais KOB₁ esta expressão foi ainda maior que nos animais selvagens. Assim, óleo induz processo inflamatório no fígado que induz a maior produção de HSP 47 sem conseqüente síntese de colágeno (Figura 19).

Outras funções ou regulações da HSP 47 no fígado não são descritas e devem ser mais bem investigadas neste grupo. Além disso, a ausência do receptor B₁ aumenta ainda mais a expressão de HSP 47 em todos os modelos estudados sugerindo uma contra-regulação dos mesmos no processo de fibrogênese, sendo a HSP 47 tendo papel pró-fibrótico e a ativação de receptor B₁ anti-fibrótico.

A Tabela 6 sumariza os dados encontrados até o momento. E podemos observar que dependendo do tipo de indução da fibrose, o animal KOB₁ respondeu de forma diferente ao agente agressor.

Se levássemos em consideração apenas a análise morfométrica poderíamos sugerir que o sistema cinina participa da fibrinogênese protegendo o órgão já que o animal KOB₁ teve menor grau de fibrose, entretanto quando observamos a expressão de HSP 47 o contrário foi observado em todos os modelos estudados. De fato, a expressão da HSP 47 está mais bem relacionada com a produção de colágeno e é descrita como indicador de fibrose (Nagata, 1996), sendo, portanto mais sensível as alterações que podem estar ocorrendo no fígado antes da alteração histológica observada.

Portanto, de acordo com os modelos estudados, no grupo soro de porco, tanto os animais selvagens quanto KOB₁ não desenvolveram fibrose, sendo ausente a expressão de B₁. No grupo CCL₄, verificamos a presença de fibrose nos dois animais, no entanto, tivemos expressão do receptor B₁ apenas em animais selvagens. No grupo BDL tivemos a presença de fibrose nos dois animias, no entanto, mais intensa nos selvagens quando comparados aos KOB₁ sendo maior a expressão da proteína nos animais selvagens.

Sugerindo uma possível participação da expressão do receptor com o progressão da fibrose (Figura 20).

Tabela 6

**Sumário das respostas hepáticas aos diferentes modelos experimentais analisados
por análise morfométrica e expressão de HSP 47**

Modelo experimental	Indução	Histologia	Selvagem		KOB ₁	
			Colágeno	HSP 47	Colágeno	HSP 47
Óleo	controle	Normal	Ø	+	Ø	+++
CCl₄	Química	Fibrose	+	+	+	++
Soro de porco	Imunológica	Inflamação	Ø	++	Ø	++
<i>Sham</i>	controle	Normal	Ø	Ø	Ø	Ø
BDL	Colestática	Fibrose cirrose	+++++	+++	++	++++ +

Figura 20

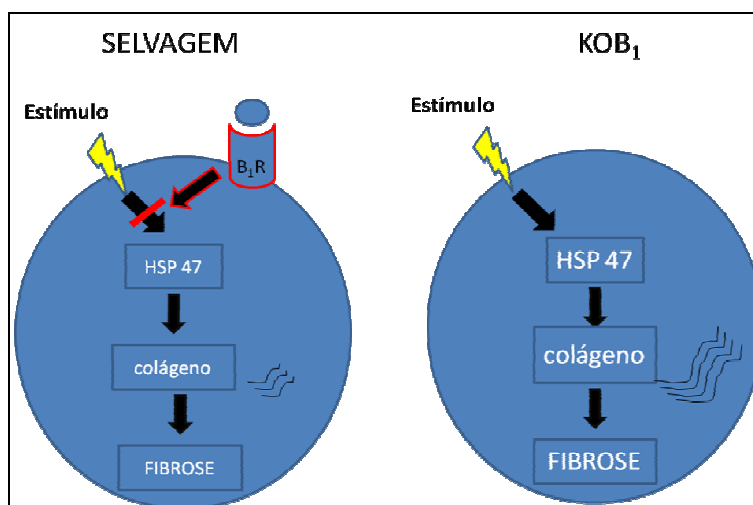
Sumário das respostas hepáticas aos diferentes modelos experimentais analisados por análise morfométrica e expressão de B₁

		SELVAGENS	KNOCKOUT	
FIBROSE	{	Soro de Porco	B ₁ ?	FIBROSE -
			FIBROSE -	
		CCl ₄	B ₁ +	FIBROSE +
			FIBROSE +	
		BDL	B ₁ ++	FIBROSE +
			FIBROSE ++	

Figura 21

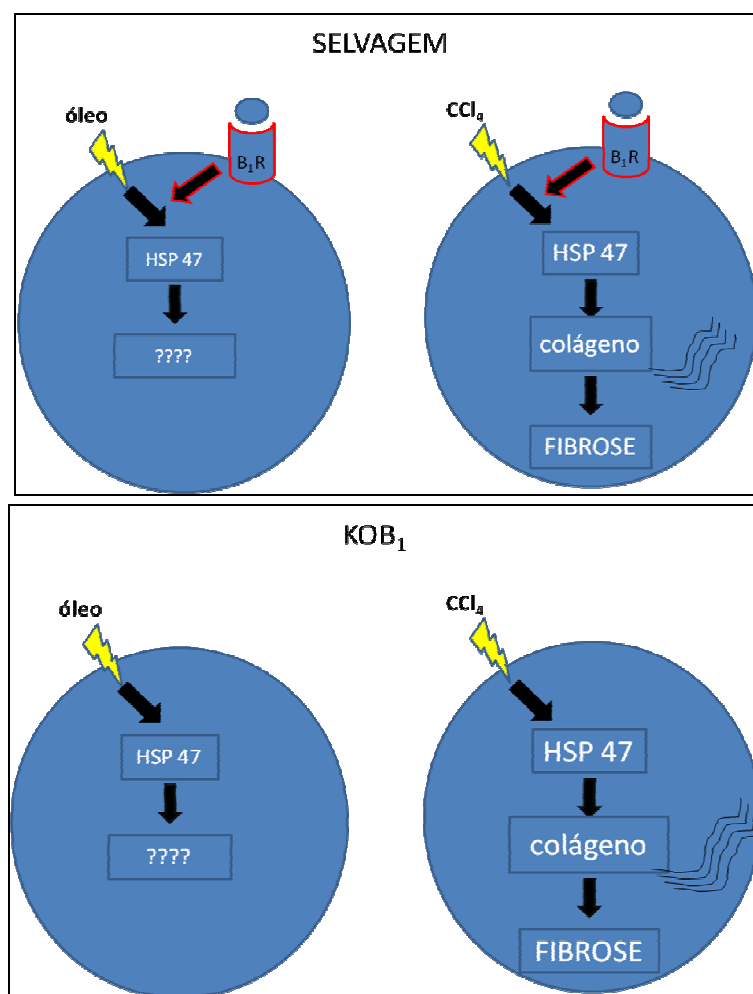
Proposta da ativação de mediadores da fibrogênese e papel do receptor B₁ de cininas

A) geral



Obs.: o tamanho da letra é proporcional a resposta.

B) grupo CCl₄



Obs.: o tamanho da letra é proporcional a resposta.

Vários autores demonstraram evidências que o receptor B₁ de bradicinina apresenta importante papel protetor em patologias relacionadas com o sistema cardiovascular como hipertensão, diabetes e doenças isquêmicas. Couture *et al* (2001) descreveu a participação dos receptores B₁ e B₂ de cininas na inflamação e dor e sugeriu a participação do receptor B₂ na fase aguda da inflamação e dor e o receptor B₁ na fase crônica deste processo. Assim, receptor B₁ teria importante papel em doenças como asma, artrite reumatóide, diabetes, esclerose múltipla, como agente papel pro-inflamatório em alguns casos e protetor no caso de doenças como a esclerose múltipla.

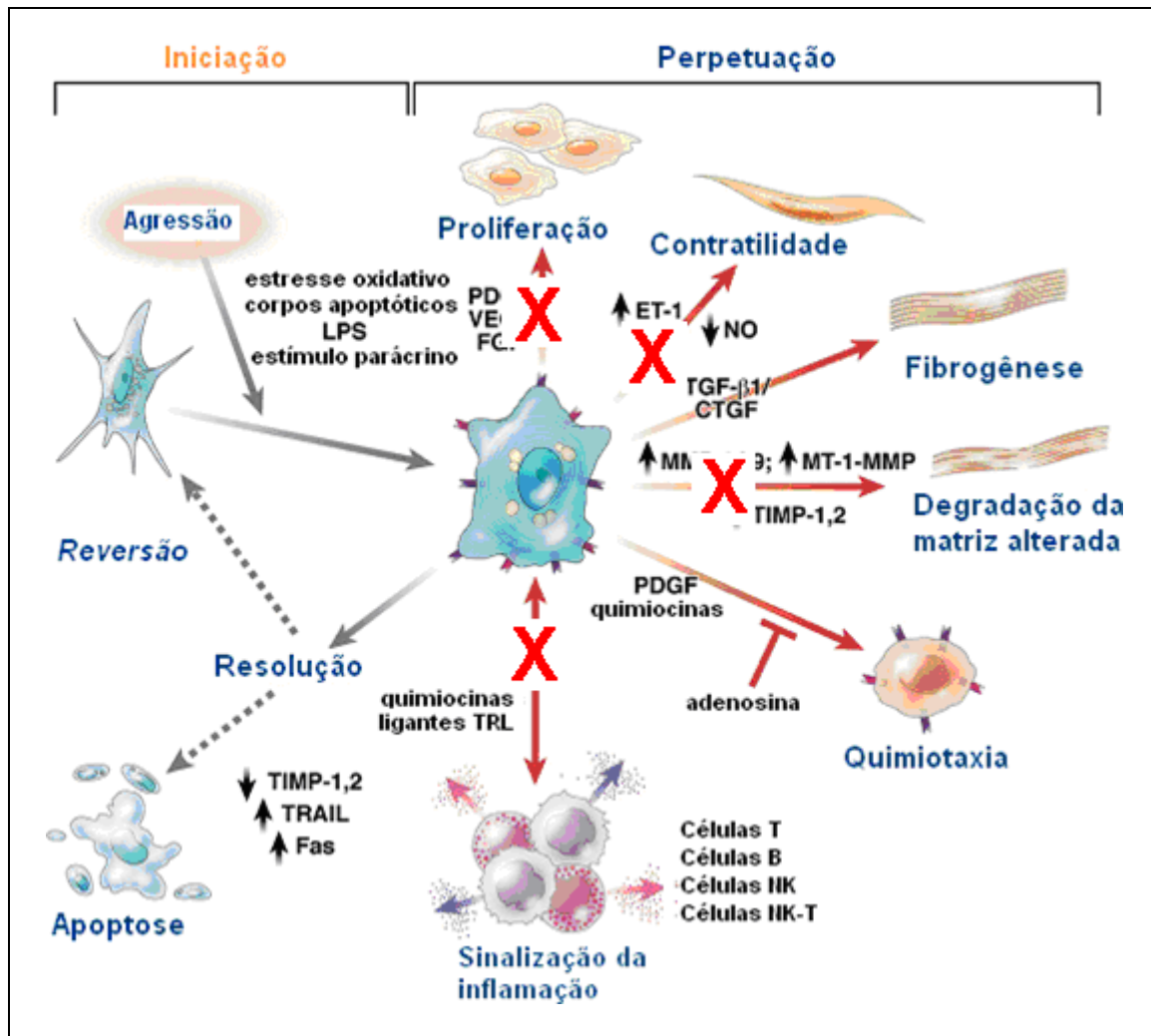
A participação direta do receptor B₁, bem como dos receptores B₂ na regulação da fibrogênese tecidual tem sido descrita em diferentes tecidos (Schanstra *et al.*, 2002; Kakoki *et al.*, 2007; Sancho-Bru *et al.*, 2007;).

Schanstra *et al.* (2002), demonstrou a participação dos receptores B₂ na fibrose renal via aumento da cascata do ativador de plasminogênio e metaloproteinase-2. Recentemente, Wang *et al.* (2009), verificou que após a obstrução uretral unilateral em animais selvagens e *knockout* do receptor B₁ de bradicinina, os animais KOB₁ tiveram prevenção da fibrose renal com aumento na produção de moléculas anti-inflamatórias como IL-10 e redução de moléculas pró-inflamatórias como TGF- β , proteína quimiotática de monócito-1, TNF- α e interleucina-6. Estes dados demonstram a participação do sistema cinina bem como o balanço de moléculas pró e anti-inflamatórias na fibrogênese renal.

Friedmann (2008) descreve as características fenotípicas típicas da etapa de perpetuação da ativação das células estreladas durante a fibrogênese e estão apresentadas na Figura 21. Assim, quais seriam os possíveis locais de atuação do receptor B₁ na proteção do fígado contra a fibrose induzida por CCl₄ ou BDL?

Figura 22

Possíveis locais de ação da ativação do receptor B₁ na proteção contra fibrose.



Ignjatovic et al., 2004 descreveram o aumento da liberação de óxido nítrico (NO) em células endoteliais pulmonares bovinas (que expressam B₁R constitutivamente) e em células endoteliais pulmonares humanas tratadas com IL-1 β para indução de B₁R. Seus dados sugerem que a ativação de B₁R via agonista desArg¹⁰-calidina ou via inibidor da ECA promove aumento da liberação de NO dependente de NO sintase endotelial (eNOS) nas células bovinas e de NO sintase induzida (iNOS) nas células humanas. Além disso, liberação de NO pela ativação de B₁R por desArg¹⁰-calidina nas células bovinas depende de Ca⁺⁺, enquanto este processo é Ca⁺⁺ independente nas células endoteliais humanas. Portanto, é possível que em nosso modelo os animais selvagens tenham uma maior produção de NO com conseqüente diminuição da contratilidade e menor efeito na perpetuação da ativação das células estreladas.

Outra característica fenotípica da ativação das células estreladas é o aumento de TGF- β e fator de crescimento de tecido conectivo na fibrogênese. Semelhante aos nossos achados, Yin *et al.* (2008) descreveram a proteção cardíaca após isquemia e reperfusão via ativação de B₂R pela calicreína, mediada por NO e diminuição da inflamação. Estes dados demonstram que a diminuição de fatores da inflamação como o TGF- β via ativação de receptor de cininas promove efeito protetor na função cardíaca e remodelamento ventricular após isquemia e reperfusão. Calixto *et al* (2000) e Souza *et al* (2004) demonstraram efeitos contrários com efeito deteriorante da ativação dos receptores de cininas na dor e inflamação e em modelo experimental de lesão por isquemia e reperfusão em intestino respectivamente.

Ricupero *et al.* (2000) demonstraram que o agonista de B₁R, desArg¹⁰-calidina, promove aumento de RNA mensageiro para α 1(I)colágeno e de CTGF em fibroblastos humanos, contribuindo para o depósito de colágeno na asma e fibrose pulmonar. Westermann *et al* (2009) demonstraram menor fibrose cardíaca em modelo experimental de diabetes por estreptozotocina (STZ) em animais KOB₁ com menor

produção de CTGF e colágeno tipo I. Em contraste, nossos resultados demonstraram maior fibrose hepática nos animais KOB₁ e sugerem que ativação de B₁R diminui a produção de colágeno.

A diminuição de MMP-2 e 9 poderia ser outro efeito da ativação de B₁R na proteção contra a fibrose. Westermann *et al* (2009) demonstraram menor produção de MMP 9 nos animais selvagens quando comparados com animais KOB₁ em modelo experimental de cardiopatia diabética. De fato, em animais *knockout* de MMP-9 ou tratados com inibidor de metaloproteinases BB94 foi observado menor grau de letalidade m modelo experimental de hepatite (Wielockx *et al.*, 2001), sugerindo o uso de inibidor de metaloproteinases no tratamento das complicações decorrentes da hepatite como a fibrose e/ou cirrose. Estes dados corroboram a nossa hipótese que a ativação de B₁R levando a menor produção de MMPs poderia ser mais um fator responsável pelo efeito protetor do B₁R na fibrose hepática nos modelos experimentais estudados.

Recentemente foi descrito o papel do receptor B₁ na quimiotaxia de células inflamatórias via CXCL5 (Duchene *et al*, 2009). Dixon *et al* (2002) demonstrou também a inibição da mitogênese induzida por PDGF via ativação de B₁R em células musculares lisas arteriais.

Em conclusão, nosso presente estudo demonstrou que no modelo soro de porco, a dose e duração do tratamento não foi capaz de induzir fibrose. No entanto no modelo CCl₄, animais selvagens e KOB₁ respondem da mesma forma. Sendo que o modelo de ligadura de ducto biliar foi o que apresentou fibrose mais intensa nos animais selvagens quando comparados ao KOB₁. De acordo com a expressão das proteínas HSP 47 e KLF-6 nos modelos estudados, observamos a maior expressão dos marcadores nos animais KOB₁. Logo, concluímos que a bradicinina está envolvida no processo de fibrogênese no modelo BDL, mas não participa na fibrogênese induzida por CCl₄. Ligantes naturais do B₁R estão sujeitos a rápida inativação por enzimas teciduais e plasmáticas, mas já

foram desenvolvidos agonistas resistentes a proteases e de longa duração que podem ser úteis no futuro para fins terapêuticos (Côté *et al*, 2009). Neste sentido, o estudo da fibrogênese com uso de agonistas fornecidos pelo Prof Dr Gobeil Jr da Universidade de Sherbrooke está em desenvolvimento no momento e deve contribuir para o completo entendimento do papel do B₁R na fibrogênese, bem como do seu possível papel terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe K, Ozono Y, Miyazaki M, Koji T, Shiohita K, Furusu A, Tsukasaki S, Matsuya F, Hosokawa N, Harada T, Taguchi T, Nagata K, Kohno S. Interstitial expression of heat shock protein 47 and alpha-smooth muscle actin in renal allograft failure. **Nephrol Dial Transplant**. 2000; 15(4): 529-35.
- Agnholt J, Mikkelsen JH, i Bud M, Moller-Petersen J, Rasmussen SN, Dyerberg J. Plasma prekallikrein as a prognostic indicator in chronic liver insufficiency. **Scand J Gastroenterol** 1990; 25(1): 40-4.
- Aldana PR, Goerke ME, Carr SC, Tracy TF. The expression of regenerative growth factors in chronic liver injury and repair. **J Surg Res**. 1994; 57(6): 711-7.
- Atkins G B, Jain K M. Role of Krüppel-Like Transcription Factors in Endothelial Biology. **Circ Res**. 2007; 100(12); 1686-1695
- Baba, Y Saeki K, Onodera T, Dói K. Serological and immunohistochemical studies on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats. **Exp Mol Pathol**. 2005; 79(3): 229-35.
- Bhunchet E, Eishi Y, Wake K. Contribution of Immune Response to the Hepatic Fibrosis Induced by Porcine Serum. **Hepatology**. 1996; 23(4):811-7.
- Bhunchet E, Fujieda K. Capillarization and venularization of hepatic sinusoids in porcine serum-induced rat liver fibrosis: a mechanism to maintain liver blood flow. **Hepatology**. 1993; 18(6): 1450-8.
- Bhunchet E, Wake K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum induced liver fibrosis. **Hepatology**. 1992; 16(1):1452-73.
- Bhunchet E, Wake K. The portal lobule in rat liver fibrosis: a re-evaluaion of the liver unit. **Hepatology**. 1998; 27: 481-7.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N Engl J Med**. 1994; 331(19): 1286-92.
- Borges DR, Gordon AH. Kininogen and kininogenase synthesis by the liver of normal and injured rats. **J Pharm Pharmacol**. 1976; 28(1): 44-8.
- Borges DR, Kouyoumdjian M. The recognition site for hepatic clearance of plasma kallikrein is on its heavy chain and is latent on prokallikrein. **J Hepatol**. 1992; 16(1-2): 115-21.

- Borges DR, Limãos EA, Prado JL, Camargo AC. Catabolism of vasoactive polypeptides by perfused rat liver. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 1976; 295(1): 33-40.
- Borges DR, Webster ME, Guimarães JA, Prado JL. Synthesis of prekallikrein and metabolism of plasma kallikrein by perfused rat liver. **Biochem Pharmacol.** 1981; 30(10): 1065-9.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 1976; 7(72): 248-54.
- Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM. Kinins in pain and inflammation. **Pain.** 2000; 87(1): 1-5.
- Canbay A, Feldstein ME, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. **Hepatology.** 2003; 38(5): 1188-98.
- Chang LM, Yeh CT, Chang PY, Chen CJ. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. **World J Gastroenterol.** 2005; 11(27): 4167-72.
- CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. *Altern Lab Anim.* 1985; 12(4).
- Clarke EP, Jain N, Brickenden A, Lorimer IA, Sanwal B. Parallel regulation of procollagen I and colligin, a collagen-binding protein and a member of the serine protease inhibitor family. **J Cell Biol.** 1993; 121(1): 193-9.
- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, Gobeil F Jr. Novel kinin B₁ receptor agonists with improved pharmacological profiles. **Peptides.** 2009;30(4):788-95.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol.** 2001; 429(1-3): 161-76.
- Cyr M, Lepage Y, Blais C JR, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, Adam A. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2001; 281(1): 275-83.
- Desmet VJ. Organization Principles. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, editors. **The liver: biology and pathobiology.** 3rd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 9-11.

- Dixon BS, Evanoff D, Fang WB, Dennis MJ. Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2002; 283(1): C193-203.
- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. **Hepatology.** 2000; 31(5): 1094-106.
- Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, Perretti M, Ahluwalia A. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. **J Immunol.** 2007; 179(7): 4849-56.
- Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology.** 2008a; 134(6): 1655-69.
- Friedman SL. Molecular Regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem.** 2000; 275(4): 2247-50 .
- Friedman SL. Targeting siRNA to arrest fibrosis. *Nat Biotechnol.* 2008b; 26(4): 431-42.
- Gandhi CR, Sproat LA, Subbotin VM. Increased hepatic endothelin-1 levels and endothelin receptor density in cirrhotic rats. **Life Sci.** 1996; 58(1): 55-62.
- Geerts A, De Bleser P, Hautekeete ML, Niki T, Wisse E. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, editors. **The liver: biology and pathobiology.** 3rd ed. New York: Raven Press; 1994. p. 819-33.
- Greenbaum LM. T-kinin and T-kininogen – an historical overview. **Adv Exp Med Biol.** 1986; 198: 55-9.
- Greenwel P, Geerts A, Ogata I, Solis-Herruzo JA, Rojkind M. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, editors. **The liver: biology and pathobiology.** 3rd ed. New York: Raven Press; 1994. p.1367-77.
- Hall JM. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. **Pharmacol Ther.** 1992; 56(2): 131-90.
- Haruki S. Structure and function of hepatic stellate cells. **Med Electron Microsc.** 2004; 37(1): 3–15.
- Ignjatovic T, Stanisavljevic S, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdös EG. Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands. **Mol Pharmacol.** 2004; 66(5): 1310-6.

- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin Augments Inflammatory and Profibrogenic Responses in the Murine Liver Induced by Hepatotoxic Chemicals. **Hepatology**. 2001; 34(2): 288-97.
- Jiang Z, You DY, Chen XC, Wu J. Monitoring of serum markers of fibrosis during CCL₄-induced liver damage. Effects of antifibrotic agents. **J Hepatol**.1992; 16(3): 282-9.
- Jungermann, K, Kietzmann, T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. **Annu Rev Nutr**. 1996; 16: 179–203.
- Junqueira CL, Carneiro L. **Basic Histology**.8th ed. Appleton & Lange; 1995.
- Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci**. 2007; 104(18): 7576-81.
- Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, Inoue M, Nakatani K, Kaneda K, Nagata K. Expression of heat-shock protein 47 in mouse liver. **Cell Tissue Res**. 1996; 284(2): 341-6
- Knittel T, Aurisch S, Neubauer K, Eichhorst S, Ramadori G. Cell-type-specific expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in Ito cells of rat liver. Up regulation during in vitro activation and in hepatic tissue repair. **Am J Pathol**.1996; 149(2), 449-62.
- Kouyoumdjian M, Nagaoka MR, Borges DR. Kallikrein-kinin system in hepatic experimental models. **Peptides**. 2005; 26(8): 1301-7.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227: 680-5.
- Lang A, Schrum LW, Schoonhoven R, Tuvia S, Solís-Herruzo JA, Tsukamoto H, Brenner DA, Rippe RA. Expression of small heat shock protein alphaB-crystallin is induced after hepatic stellate cell activation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** .2000; 279(6): 1333-42.
- Liu C, Gaça MD, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are diferentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta) in quiescent and activated hepatic stellate cells. Constitutive nuclear localization of Smads in activated cell is TGF-beta-independent. **J Bio Chem**. 2003; 278(13): 11721-8.

- Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCL₄-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa b binding. **Hepatology**. 1995;;22(5): 1474-81.
- Manoukian N, Borges DR. Prealbumin, prekallikrein and prothrombin in hepatosplenic schistodiasis: increased turnover of the clotting proteins? **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 1984; 26(5): 237-40.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B₁ receptors for kinins. **Pharmacol Rev**.1998; 50(3): 357-86.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. Kinin receptors: functional aspects. **Int Immunopharmacol**. 2002; 2(13): 1729-39.
- Margolius HS. Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. **Hypertension**. 1995; 26(2): 221-9.
- Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. **Front Biosci**. 2002; 7: 1899-914.
- Masuda H, Fukumoto M, Hirayoshi K, Nagata K. Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1(I) and alpha 1(III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. **J Clin Invest**. 1994; 94(6): 2481-8.
- McCuskey RS, Reilly FD. Hepatic microvasculature: dynamic structure and its regulation. **Semin Liver Dis**. 1993; 13(1): 1-12.
- McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arteriole and hepatic sphincters. **Am J Anat**. 1966; 119(3): 455-87.
- McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. **Liver**. 2000; 20(1): 3-7.
- Nagaoka MR, Gomiero L , Teixeira FO, Agostino FG , Pouza JEP, Mimary P, Borges DR, Kouyoumdjian M. Is the expression of kinin B₁ receptor related to intrahepatic vascular response? **Biochim Biophys Acta**. 2006; 1760(12): 1831–6.
- Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. **Trends Biochem Sci**. 1996; 21(1): 22-6.
- Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Hepatic sinusoidal cells in liver physiology and pathology. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. **Med Electron Microsc**. 2004; 37: 29–36

- Nakatsukasa H, Evarts RP, Hsia CC, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. **Lab Invest.** 1990; 63(2): 171-80.
- Nusselein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. **Nature.** 1980; 287: 795-801.
- Ohno H, Naito Y, Nakajima H, Tomita M. Construction of a biological tissue model based on a single-cell model: a computer simulation of metabolic heterogeneity in the liver lobule. **Artif Life.** 2008; 14(1): 3-28.
- Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F. Proangiogenic role of tumor activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. **Hepatology.** 2003; 37(3): 674-85.
- Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B₁ receptors. **Proc Natl Acad Sci** 2000; 97(14): 8140-5.
- Pinzani M, Marra F. Stellate Cells. In: Dufour JF, Clavien PA. **Signaling Pathways in Liver Diseases.** Berlin: Springer; 2005; 27-42.
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polpar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. **J Cell Physiol.** 2002; 193(3): 275-86.
- Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. **Proc Natl Acad Sci.** 1998; 95(16): 9500-5.
- Reynaert H, Thompson M G, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. **Gut.** 2002; 50(4): 571–81.
- Ricupero DA, Romero JR, Rishikof DC, Goldstein RH. Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B₁ receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. **J Biol Chem.** 2000; 275(17): 12475-80.
- Rocha e Silva M, Beralto WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **Am J Physiol.** 1949; 156: 261-73.

- Rockey DC, Bissell DM. Noninvasive measures of liver fibrosis. **Hepatology** 2006; 43(2)(Suppl 1): S114
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. **Clin Liver Dis.** 2006; 10(3): 459-79.
- Rockey DC. Vascular Mediators in the Injured Liver. **Hepatology.** 2003; 37(1):4-12.
- Sancho-Bru P, Bataller R, Fernandez-Varo G, Moreno M, Ramalho LN, Colmenero J, Marí M, Clària J, Jiménez W, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. **Gastroenterology.** 2007; 133(6): 2019-28.
- Sauk JJ, Smith T, Norris K, Ferreira L. Hsp47 and Translation-Translocation Machinery Cooperate in the Production of $\alpha 1(I)$ Chains of Type I Procollagen. **J Biol Chem.** 1994; 269(6): 3941-6
- Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami JP, Bascands JL. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. **J Clin Invest.** 2002; 110(3): 371-9.
- Simeonova PP, Gallucci RM, Hulderman T, Wilson R, Kommineni C, Rao M, Luster MI. The role of tumor necrosis factor- α in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2001; 177(2): 112-20.
- Song JY, Lia L, Ahna JB, Parka JG, Joa JS, Parkb DH, Jangc HK, Jangd JJ, Leea MJ, Acute liver toxicity by carbon tetrachloride in HSP70 knock out mice. **Exp Toxicol Pathol.** 2007; 59(1): 29–34.
- Souza DG, Lomez ES, Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, Teixeira MM. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. **J Immunol.** 2004; 172(4): 2542-8.
- Takahara T, Solberg S, Muona P, Vitto J. Type VI collagen gene expression in experimental liver fibrosis: quantitation and spatial distribution of mRNAs, and immunodetection of the protein. **Liver.** 1995; 15(2): 78-86.
- Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? **Hepatology.** 1983; 3(1): 112–20.
- Van De Bovenkamp M, Groothuis GMM, Draaisma AL, Merema MT, Beuijzen JI, Van Gils MJ, et al. Precision cut liver slices as a new model to study toxicity – induced

- hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. **Toxicol Sci.** 2005; 85(1): 632-8.
- Wang PH, Cenedeze MA, Campanholle G, Malheiros DM, Torres HA, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Câmara NO. Deletion of bradykinin B₁ receptor reduces renal fibrosis. **Int Immunopharmacol.** 2009; 9(6): 653-7.
- Wang PHM, Cenedeze MA, Campanholle G, Malheiros DMAC, Torres HAM, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Câmara NOS. Deletion of bradykinin B₁ receptor reduces renal fibrosis. **Int Immunopharmacol.** 2009; 9(6): 653-7.
- Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, Riad A, Bader M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Gene deletion of the kinin receptor B₁ attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. **Diabetes.** 2009; 58(6): 1373-81.
- Wielockx B, Lannoy K, Shapiro SD, Itoh T, Itohara S, Vandekerckhove J, Libert C. Inhibition of matrix metalloproteinases blocks lethal hepatitis and apoptosis induced by tumor necrosis factor and allows safe antitumor therapy. **Nat Med.** 2001; 7(11): 1202-8.
- Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. **Semin Liver Dis.** 1997; 17(4): 265-86.
- Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. **J Clin Invest.** 1994; 94(4): 1563-9.
- Xu J, Carretero OA, Shesely EG, Rhaleb NE, Yang JJ, Bader M, Yang XP. The kinin B₁ receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice. **Exp Physiol.** 2009; 94(3): 322-9.
- Yin H, Chao L, Chao J. Nitric oxide mediates cardiac protection of tissue kallikrein by reducing inflammation and ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion. **Life Sci.** 2008; 82(3-4): 156-65.