

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**A CONTRIBUIÇÃO DO FATOR TRANSFORMADOR DE
CRESCIMENTO BETA 1 - TGF- β 1 NA FIBROSE
HEPÁTICA: ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

TESE DE DOUTORADO

FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Porto Alegre, Brasil, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**A CONTRIBUIÇÃO DO FATOR TRANSFORMADOR DE
CRESCIMENTO BETA 1 - TGF- β 1 NA FIBROSE
HEPÁTICA: ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO***

FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Themis Reverbel da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ursula da Silveira Matte

“A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor”.

Porto Alegre, Brasil, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO

ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO / TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

16 /06/2009

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

PROF. DR. Claudia Oliveira

Universidade do Estado de São Paulo

PROF. DR. Mario Reis

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROF. DR. Lavinia Shuler Faccini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROF. DR. Cristina Targa Ferreira

Hospital de Clinicas de Porto Alegre

O48c Oliveira, Fernanda dos Santos

A contribuição do fator transformador de crescimento beta 1-TGF β 1 na fibrose hepática: estudos *in vivo* e *in vitro* / Fernanda dos Santos Oliveira; orient. Themis Reverbel da Silveira; co-orient. Ursula da Silveira Matte. – 2009.

114 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Fator transformador de crescimento beta1 2. Cirrose hepática 3. In Vitro I. Silveira, Themis Reverbel II. Matte, Ursula da Silveira III. Título.

NLM: WI 725

Catálogo na Fonte: Shirlei Salort- Bibliotecária CRB/10-1929

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família;

A meus pais, inicio de tudo: a meu pai Boaventura, pelo exemplo incomensurável de ciência assistencial humana, à minha mãe Luiza, pela parceria incondicional na minha vida, como exemplo de mãe e mulher.

Ao meu marido Jarbas, pelo exemplo de fazer ciência, pelo exemplo de como levar a vida com prazer, pelo amigo de todas as horas e principalmente pela enorme coragem que me passou quando acreditou que eu poderia.

A minhas filhas Rafaela e Roberta, por escutarem minhas histórias lindas de “ratinhos” e “células maravilhosas”, pelo tempo em que eu não estava presente, e principalmente por me fazer feliz todos os dias dessa vida. AMO VOCÊS!

Obrigado a Deus por me permitir tamanho avanço.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Tudo começou quando uma baiana me aceitou em seu grupo. **Sandra Vieira**,

Amo-te muito! Obrigado por me “puxar para cima” e por ter me apresentado a tantas pessoas que serão importantes para o resto de minha vida..

Duas delas formam minha base profissional e científica:

À Professora Doutora **Themis Reverbel da Silveira**, muito obrigada por ter me aceito como orientanda, por acreditar em minhas idéias. Agradeço principalmente pelo tempo que passei no seu grupo, pelo seu exemplo de fazer ciência com inovação, com gana, com respeito e com seriedade.

À Professora Doutora **Úrsula Matte**, obrigada por me fazer crescer tanto, pelas inúmeras horas de orientação, por acreditar nas minhas idéias sem lógica imediata, por estar ao meu lado sempre nestes anos, pelo exemplo de profissional competente e dedicada.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga argentina Carolina Uribe, que me ensinou com presteza a manipular esses “mini seres-vivos” que são as células em cultura. Pela paciência, pelas discussões científicas, pelas brigas por pontos de vista... Tudo isso enriqueceu este trabalho e construiu uma amizade forte.

Ao Guilherme Baldo, querido colega de bancada, de ajuda nos momentos complicados, de diversão plena e coleguismo absoluto.

Ao Dr. Jorge dos Santos, pela contribuição científica, pelas discussões ricas, pelo carinho diário.

Ao Álvaro, colega da Hepatologia: obrigado pela paciência, obrigada pela companhia diária, e principalmente te agradeço por agüentar meus surtos e me tranqüilizar com uma sabedoria campeira singular.

Ao Dr. Carlos Kieling, pelas discussões científicas e pela análise estatística.

À Valeska Lagranha, pela ajuda na bancada em tantos momentos de dúvidas.

A todo o pessoal do Centro de Terapia Gênica: Fernanda Pereira, Angela Tavares e muitos outros que dia a dia dividiram espaço, idéias, resultados positivos e negativos.

Aos meus colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia: Rafael Maurer, Ariela, Patricia Edon, pelo coleguismo.

Às minhas meninas “forminguinhas” – Joseane Muller, Barbara Gros mamm e Patricia de Leon, gurias, obrigado por aprendermos juntas tantas técnicas e por agüentarem minhas elucubrações. Queridas, obrigado!

À Dra Vera Camacho por doar os anticorpos para análise dos tecidos.

À querida amiga Rosane Blanguer, pela dedicação ao seu trabalho, pela presteza e pelo carinho durante esse tempo. Obrigada!

À Flavia, pela presteza no seu trabalho, pelo sorriso, pelo café de todas as horas.

À Unidade Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela sua infraestrutura e pessoal excelentes.

Ao Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela qualidade de seus laboratórios e demais estruturas.

Ao CNPq e ao FIPE, pela base financeira que este trabalho recebeu.

A todos que contribuíram de tantas formas para que este trabalho acontecesse.

EPÍGRAFE

“Nós sabemos como a sequência de nossos pensamentos deve acabar [...] é evidente que não tenha outra forma de começar que não seja ao acaso. Nossa mente segue o primeiro caminho que encontra disponível, percebe que é uma rota falsa, retraça seus passos e toma outra direção [...]. Através de um tipo de seleção artificial nós podemos aperfeiçoar substancialmente nossos próprios pensamentos e torná-los cada vez mais lógicos”.

Paul Souriau, 1881

“...Viver, e não ter a vergonha de ser feliz

Cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz...”

Gonzaguinha

RESUMO

A fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular em resposta à lesão hepática crônica. Importantes causas de lesões hepáticas crônicas são: hepatites virais, doenças metabólicas, doenças auto-imunes e exposição a substâncias químicas, como álcool ou drogas. As células estreladas hepáticas e o TGF- β 1, uma das citocinas responsáveis pela sua ativação, têm sido descritos como os principais envolvidos neste processo. Neste trabalho buscamos avaliar, *in vivo*, o comportamento do TGF- β 1 no desenvolvimento da fibrose hepática e verificar, *in vitro*, o efeito da sua diminuição em células estreladas hepáticas ativadas. Inicialmente analisamos a relação dos níveis séricos de TGF- β 1 com a densidade de colágeno no tecido hepático em modelo murino de cirrose por Tetracloreto de Carbono. Observou-se que há uma correlação negativa entre os níveis séricos de TGF- β 1 e a densidade de colágeno no tecido hepático neste modelo. A seguir, buscou-se avaliar os níveis séricos e a expressão tecidual de TGF- β 1 em pacientes com Atresia Biliar no momento do diagnóstico e ao transplante, correlacionando com a densidade de colágeno no tecido hepático e com marcadores séricos da doença (APRI e contagem de plaquetas). Neste estudo verificou-se que os níveis séricos de TGF- β 1 não se relacionam com a densidade de colágeno e tampouco com sua expressão no tecido. Os pacientes no momento do transplante possuíam valores baixos de TGF- β 1, tanto em relação ao grupo diagnóstico como em relação aos controles. Contudo, ao diagnóstico observou-se uma correlação negativa do TGF- β 1 com a contagem de plaquetas. Nos estudos *in vitro* usou-se a linhagem celular GRX para avaliar o efeito do tratamento de células estreladas hepáticas com Anfotericina B sobre os níveis de TGF- β 1 e sua reversão ao fenótipo quiescente. Verificou-se que a droga foi eficiente, diminuindo a proliferação celular e reduzindo os níveis de expressão de TGF- β 1, com reversão ao fenótipo de lipócito. Na mesma linhagem celular foi avaliado o efeito do silenciamento da expressão de TGF- β 1 com o uso de RNA de interferência. Após transfecção com lipofectamina foi detectada uma redução de 20% da expressão de TGF- β 1 por PCR em tempo real. Através do uso de um gene marcador observou-se que a eficiência de transfecção foi de menos de 10%. Em conjunto, estes achados corroboram a importância do TGF- β 1 no processo de fibrogênese, inclusive na doença hepática infantil. Além disso, a redução dos níveis dessa citocina nos estágios finais da doença indicam que o uso do TGF- β 1 como alvo terapêutico possui uma janela de tempo bem definida para que possa ser efetivo. Neste sentido, a Anfotericina B poderá ser uma alternativa terapêutica para o tratamento da fibrose hepática. Por outro lado, ferramenta de RNAi necessita de métodos de

transferência mais eficientes e seguros para futuramente tratar pacientes com doença hepática crônica.

ABSTRACT

Liver fibrosis is characterized by the accumulation of extracellular matrix in response to chronic liver injury. Important causes of chronic liver injury are viral hepatitis, metabolic diseases, autoimmune diseases, and exposure to chemicals such as alcohol or drugs. Hepatic stellate cells and TGF- β 1, one of the cytokines responsible for their activation, have been described as major players involved in this process. In this study we sought to evaluate, *in vivo*, the behavior of TGF- β 1 in the development of hepatic fibrosis and verify, *in vitro*, the effect of its decrease in activated hepatic stellate cells. First we analyzed the relationship between serum TGF- β 1 and collagen density in liver tissue in a rat model of cirrhosis by Carbon Tetrachloride. A negative correlation between serum levels of TGF- β 1 and collagen density in liver tissue was observed. Next, we tried to evaluate the serum levels and tissue expression of TGF- β 1 in patients with biliary atresia at the time of diagnosis and at liver transplantation, correlating with collagen density in liver tissue and serum markers of the disease (APRI and platelet count). It was shown that serum levels of TGF- β 1 do not correlate with collagen density or with TGF- β 1 expression in the tissue. Patients at the time of liver transplantation presented low levels of TGF- β 1 compared both to patients at diagnosis and to controls. However, a negative correlation between TGF- β 1 and platelet count was observed at the time of diagnosis. For *in vitro* studies, the GRX cell line was used to assess the effect of Amphotericin B on TGF- β 1 levels and their reversion to a quiescent phenotype. The drug was effective, reducing the cell proliferation rate, TGF- β 1 expression and reversion to the lipocyte phenotype. In the same cell line RNA interference for silencing the expression of TGF- β 1 was evaluated. After transfection with lipofectamine a reduction of 20% in TGF- β 1 was detected by real time PCR. Using a marker gene it was observed that the transfection efficiency was less than 10%. Taken together, these findings corroborate the importance of TGF- β 1 in the process of fibrogenesis, including in liver disease in children. Moreover, the decrease of this cytokine in end stage liver disease shows that the use of TGF- β 1 as a therapeutic target for fibrosis is time dependent. In this sense, Amphotericin B may be a good option for treating for liver fibrosis. On the other hand, RNAi needs more efficient and safe delivery methods should it be used to treat patients with chronic liver disease in the future.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 1.** Representação esquemática do sinusóide hepático. Células endoteliais sinusoidais (SEC) limitam o sinusóide onde estão localizadas as células de Kupffer. As células estreladas (HSC) estão no espaço de Disse, entre a linha endotelial e as células parenquimatosas (CP), neste caso representadas pelos hepatócitos.----- 15
- Ilustração 2: A** - Parênquima hepático normal: As células estreladas estão de forma quiescente no espaço de Disse. **B** - Parênquima Hepático lesado- Mudanças na matriz do tecido hepático e celular na fibrose. Células estreladas estão ativadas e levam a acumulação de matriz extracelular. Este ambiente contribui para a perda do sinusóide fenestrado (Friedman SL, 2000)----- 20
- Ilustração 3:** Uma das maneiras de início do processo de ativação das células estreladas: a apoptose de hepatócitos leva à formação de corpos apoptóticos, que são fagocitados pelas células de Kupffer, células estreladas hepáticas ou hepatócitos saudáveis, as quais liberam TGF- β 1 e MIP-2 (Proteína Inflamatória de Macrófago), citocina profibrogênicas que ativam as células estreladas e induzem a síntese de colágeno tipo I (Kisseleva and Brenner, 2005).----- 23
- Ilustração 4:** Transformação de célula estrelada em miofibroblasto. Após dano as células estreladas modificam-se fenotipicamente. (Adaptado de Friedman 2000); ----- 25
- Ilustração 5** – Via de sinalização celular do TGF- β 1 (Gordon, 2008)----- 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potenciais alvos para tratamento da fibrose hepática, seus possíveis inibidores e situação dos ensaios. Adaptado de Fowell A.J., et al, 2006.-----	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB - Anfotericina B

AVB - Atresia de Vias Biliares

BMP-7 - Proteína morfogênica de osso -7

CCl₄ - Tetracloreto de Carbono

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

EMT - Transição Epitélio Mesenquimal

γGT - gama glutamil-transpeptidase

HGF - Fator de Crescimento de Hepatócitos Humanos

HSC - Células Estreladas Hepáticas

KC - Células de Kupffer

kPa - Kilopascals

LAK - Lymphokine-Activated Killer (em inglês)

LDB - Ligadura de Ducto Biliar

MEC - Matriz Extracelular

MMP1 - Metaloproteinase de Matriz 1

MIP 2 - Proteína Inflamatória de Macrófago

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

NFκB - Fator Nuclear Kappa Beta

NASH - Esteato-hepatite não alcoólica

NIH - Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos Americano

NK - Natural Killer

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

RNA – ácido ribonucleico

RNAi - RNA de Interferência

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SEC - Células Endoteliais Sinusoidais

siRNA - small interfering RNA interferente

shRNA – short harping RNA (em inglês)

SVRs - Sustained Virological Responders

TGF- β 1 – Fator transformador de Crescimento β 1

TIMPs - Inibidores de Metaloproteinases do Tecido

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNI - Testes Não Invasivos

TNF α - Fator Alfa de Necrose Tumoral

TRAIL - Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

uPA - Uroquinase Ativadora de Plasminogênio Humano

VEGF - Fator de Crescimento de Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Considerações Gerais	17
1.2. Fibrose Hepática	19
1.3. Células estreladas hepáticas e fibrose	22
1.3.1. Fator Transformador de Crescimento β 1 e fibrose hepática	27
1.3.2. Linhagem de Célula Estrelada GRX	30
1.4. Estratégias potenciais para a terapia anti-fibrótica.	31
1.4.1. Artigo 1- Atualizando o Código Genético: O RNA de Interferência um comentário sobre o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2006	34
2. JUSTIFICATIVA	39
3. HIPÓTESE	39
4. OBJETIVO GERAL	40
4.1. Objetivos específicos	40
RESULTADOS	41
5.1. Artigo 2 - Relação entre TGF β1 sérico e densidade de colágeno no tecido de ratos tratados com Tetracloreto de Carbono.	41
5.2. Artigo 3 - Relationship between serum TGF-β1 and collagen density in liver tissue of rats receiving Carbon Tetrachloride	41
5.3. Artigo 4 - Amphotericin B decreases TGF-β1 in GRX cells, a model of activated myofibroblasts	41
5.4. Artigo 5 - Transient transfection of shRNA using cationic lipids in a cell line of hepatic stellate cells	41
Relação entre TGF -β1 sérico e densidade de colágeno no tecido de ratos tratados com Tetracloreto de Carbono.	42
5. DISCUSSÃO	99
6. CONCLUSÕES	109
7. BIBLIOGRAFIA	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

O fígado de um ser humano adulto e normal pesa em torno de 1,5 kilogramas, é macio e de cor avermelhada. Localiza-se na região superior direita do abdômen, sob o diafragma. Possui duplo aporte sanguíneo, sendo irrigado pela artéria hepática e pela veia porta (Sheila Sherlock e James Dooley. *Diseases of the liver and Biliary System*, 2002). É o maior órgão sólido do corpo humano e é essencial para manter o funcionamento normal do organismo. Isto porque ele desempenha um importante papel no metabolismo, tendo entre outras funções: excretar inúmeras substâncias, produzir proteínas para o sistema imune e ainda contribui para proteção contra germes e bactérias. Entre as diversas proteínas que sintetiza, estão as proteínas que, regulam a coagulação sanguínea. A bile, substância necessária para a digestão de alimentos e absorção de gorduras, também é produzida e excretada pelo fígado (Schiff , *Textbook of Hepatology*, 2008).

O fígado é constituído em 4 lobos: lobo direito (o maior), lobo esquerdo, lobo caudado e lobo quadrado. Histologicamente o órgão é constituído por células parenquimatosas e por células não parenquimatosas. As células do parênquima são os hepatócitos (que constituem em torno de 80% do volume total do órgão) e as células biliares. As células não parenquimatosas são as células endoteliais sinusoidais (SEC), células de Kuppfer (KC) e células estreladas hepáticas (HSC). Estas últimas são também denominadas células estocadoras de gordura, células de Ito, lipócitos, ou ainda células ricas em vitamina A. (Sheila Sherlock e James Dooley. *Diseases of the liver and Biliary System*, 2002). A figura 01 mostra uma representação esquemática do sinusóide hepático, com a localização dos tipos celulares mencionados acima.

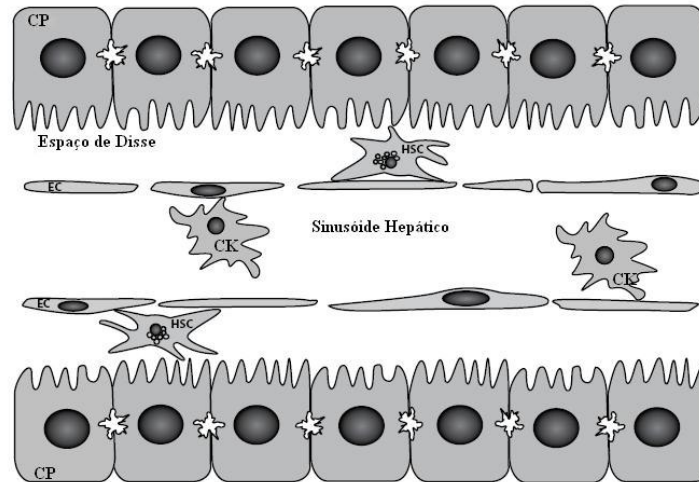


Ilustração 1: Representação esquemática do sinusóide hepático. Células endoteliais sinusoidais (SEC) limitam o sinusóide onde estão localizadas as células de Kupffer. As células estreladas (HSC) estão no espaço de Disse, entre a linha endotelial e as células parenquimatosas (CP), neste caso representadas pelos hepatócitos

Os hepatócitos são as principais células do fígado, responsáveis pela sua atividade metabólica e pela secreção de componentes da bile (Meijer and Molema 1995). O endotélio hepático é fenestrado, o que possibilita a filtração de componentes do sangue para o hepatócito. As SEC são células produtoras e secretoras de citocinas, mediadoras de atividade celular. As células de Kupffer são os macrófagos teciduais do fígado que controlam a fase inicial da inflamação e também têm um papel importante na defesa inata do organismo (Kmieć Z. 2001). Assim como as SEC, possuem uma grande capacidade endocítica para muitos ligantes, incluindo glicoproteínas e componentes da matriz extracelular (MEC). As células estreladas hepáticas, pelo seu importante papel na fibrogênese, serão discutidas em maior detalhe posteriormente.

1.2. Fibrose Hepática

A fibrose hepática é caracterizada pelo acúmulo de tecido cicatricial em resposta à lesão hepática crônica. Importantes causas de lesões hepáticas crônicas são: hepatites virais, doenças metabólicas, doenças auto-imunes e exposição a substâncias químicas, como álcool ou drogas (Friedman et al. 2000). Atualmente o número de indivíduos obesos vem aumentando na população mundial e a esteatohepatite não alcoólica é uma das principais causas de fibrose hepática e (Denechaud et al. 2008). Na população pediátrica, a principal causa de doença hepática crônica é a atresia biliar (Bezerra 2006).

A atresia de vias biliares (AVB) é a doença hepática crônica mais prevalente no grupo pediátrico e é o resultado da obliteração dos ductos biliares extrahepáticos por um processo inflamatório e fibrótico progressivos. A causa da atresia de vias biliares é incerta, contudo acredita-se que fatores tais como malformações congênitas, infecção por vírus durante a gestação, exposição a toxinas e anormalidades do sistema imune possam contribuir na patogênese da AVB (de Carvalho et al. 2007).

O tratamento inicial para a AVB é a cirurgia de portoenterostomia, ou cirurgia de Kasai, nos primeiros 60 dias de vida, e que tem como objetivo drenar a bile do fígado para o jejuno. Contudo se a portoenterostomia não for bem sucedida ou não realizada, o transplante de fígado é o único tratamento possível. Mesmo com êxito, muitas das crianças que fazem a cirurgia de Kasai, evoluem para a cirrose. As taxas de sobrevivência sem transplante de fígado são de aproximadamente 20% até 20 anos de idade (Sokol 2009).

Em contraste com o processo inflamatório agudo, que é caracterizado por rápidas alterações vasculares, edema e inflamação neutrofílica, a fibrose resulta de uma inflamação crônica, definida como uma resposta imune persistente na qual o remodelamento do tecido e

os processos de cicatrização ocorrem simultaneamente. (Friedman 2008). Conforme a descrição de Mallory (1948), o fígado possui a capacidade de produzir os componentes da matriz extracelular em resposta a algum dano. Quando esta produção ocorre em excesso ou suplanta a capacidade de absorção, culmina com o remodelamento da arquitetura tecidual que contribui para a formação da cirrose. O processo fibrótico ocorre, na maioria das vezes, de forma silenciosa e em seu estágio mais avançado progride para a cirrose (Mallory 1948).

Não há consenso em relação a “irreversibilidade” da cirrose. A idéia de reversibilidade desta vem ganhando força no meio científico (Gieling et al. 2008). Friedman e Bansal (2006), contudo, sugerem que o termo **reversão** seja abolido, pois este indica retorno à normalidade do parênquima. Em troca, o mais correto seria referirmos à **regressão** da fibrose, o que sugere uma diminuição, que pode ou não resultar em uma histologia normal. Existem evidências de que a fibrose regride e muitos avanços já foram feitos em relação a esse ponto (Friedman and Bansal 2006).

O desenvolvimento da fibrose depende do fator causal e de condições próprias dos indivíduos. Em alguns a evolução para a cirrose ocorre mais rapidamente do que em outros. Acompanhar este processo silencioso e/ou conseguir que ele não avance é um dos principais objetivos para evitar as complicações típicas da doença hepática crônica. Por isso o acompanhamento de pacientes portadores de vírus C, NASH ou outras doenças crônicas que possam levar à fibrose é de grande importância.

O padrão áureo para demarcar o estágio da fibrose ainda é a biópsia hepática. A avaliação anatomopatológica, utilizando diferentes escores, tais como os de Ishak, Desmet ou Metavir, podem ser utilizados para analisar o grau de evolução da doença, (Meijer and Molema 1995). Para a atresia de vias biliares utiliza-se o escore de Weerasooriya (Weerasooriya et al. 2004) que categoriza a doença em quatro graus: 0 – ausência de fibrose; 1 - fibrose leve, presença de expansão portal em menos de 50% dos folhetos portais; 2 -

moderada, se fibrose presente em mais de 50% dos arranjos portais sem arquitetura nodular; 3 - se houver fibrose em ponte em mais de 50% do arranjos portais, acompanhadas de arquitetura nodular. Entretanto, há estudos que demonstram que a biópsia pode não representar a realidade do órgão (Guido and Rugge 2000), (Sebastiani and Alberti 2006). Além disso, é um método invasivo com algum grau de risco ao paciente, e principalmente no que se refere ao acompanhamento do paciente por um determinado período de tempo, é impraticável como método repetitivo. Portanto a busca de marcadores não invasivos é de grande importância.

Uma série de métodos, incluindo índices sorológicos e quantificação da elasticidade do fígado (elastografia), tem sido proposta para a avaliação não invasiva da fibrose hepática, com maior experiência nos estudos com em pacientes com hepatite crônica C Prevê-se que estes métodos não invasivos se tornarão uma ferramenta importante na prática clínica num futuro próximo (Castera 2008) Como ferramenta promissora nesta área está o Fibroscan®, (Artemis Medical Ltd, UK), um equipamento que através de elastografia quantifica a densidade do fígado, representando-a como uma variável numérica (kilopascals, kPa) (de Ledinghen et al. 2007).

No que se refere aos marcadores sorológicos, o Fibrotest é um escore que se baseia na relação entre os resultados dos marcadores: g-glutamyl-transpeptidase (g-GT), bilirrubina total, a2-macroglobulina, apolipoproteína A1 e haptoglobina. Além do desenvolvimento de FibroTest , um grande número de outros marcadores sorológicos são utilizados isoladamente ou em combinações (Castera et al. 2009). O índice APRI (*AST Platelet Ratio Index*) é baseado na razão entre os valores de AST e das plaquetas do paciente. Foi padronizado por Wai *et al.*, (2003) para portadores de vírus C. Mostrou uma boa sensibilidade para diagnosticar fibrose avançada e cirrose (Wai et al. 2003).

1.3. Células estreladas hepáticas e fibrose

Descritas por Ito na década de 50 (Ito and Nemoto 1952) como uma célula não parenquimatosa e diferente de macrófagos, mas observadas pela primeira vez por Von Kupffer, em 1876, como uma célula de “formato estelar”, ao longo dos anos a célula estrelada hepática recebeu inúmeras denominações que incluem: células perinusoidais, células de Ito, lipócito, ou ainda célula armazenadora de gordura (Ramadori 1991). Estão localizadas no espaço de Disse entre as células endoteliais e as do parênquima (figura 02). A principal função destas células em um fígado normal é o estoque e a manutenção do controle de retinóis. Por este fato, elas provavelmente estão envolvidas com neurotransmissores locais e com a regulação parácrina de diversas funções do órgão, incluindo controle do fluxo sanguíneo e manutenção da homeostase da MEC. No fígado lesado estas células são encontradas como miofibroblastos e são fenotipicamente diferentes das células quiescentes. Os estudos que revelaram que as células estreladas seriam as precursoras dos miofibroblastos encontrados no parênquima do fígado lesado, conduziram ao explosivo crescimento do número de pesquisas com estas células. (Herrmann et al. 2007).

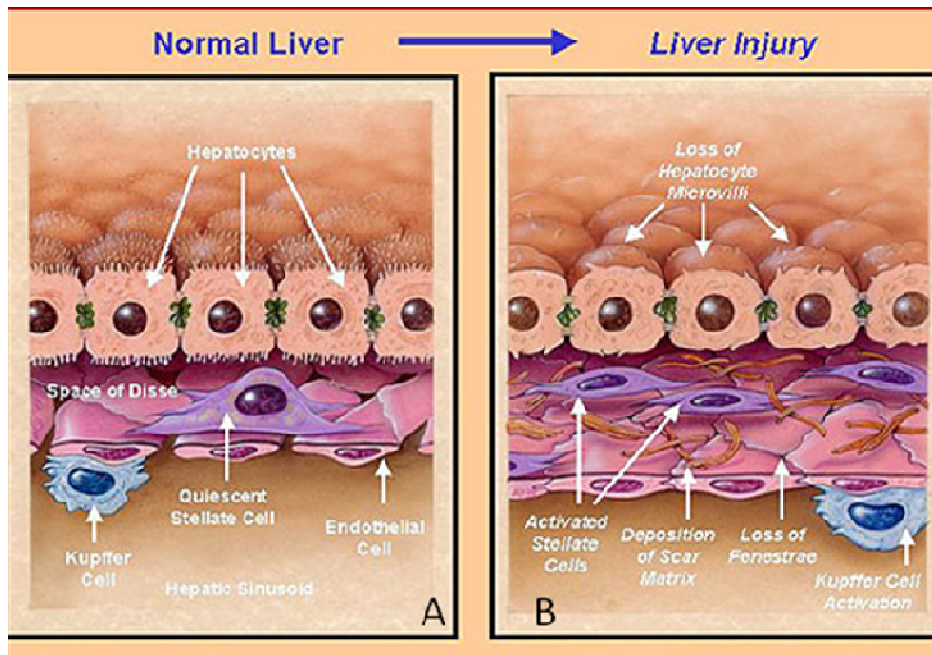


Ilustração 2: A - Parênquima hepático normal: As células estreladas estão em estado quiescente no espaço de Disse. B - Parênquima hepático lesado: As células estreladas estão ativadas e depositam matrizes extracelulares, levando à perda do sinusóide fenestrado (Friedman 2000)

A ativação das células estreladas compreende muitos mecanismos, que podem ser resumidos em três fases: **iniciação** ou fase pré-inflamatória, **perpetuação** e **resolução**, quando o dano hepático é resolvido. Essas fases são descritas com detalhes a seguir conforme a descrição de Friedman (2000).

Iniciação: as primeiras mudanças na expressão gênica e fenotípica das células estreladas ocorrem devido a estímulos parácrinos vindos de células vizinhas, como plaquetas, células do endotélio sinusoidal e hepatócitos. Estes últimos são potentes fontes de espécies reativas de oxigênio, geradas quando ocorre dano à membrana e peroxidação lipídica. De forma diferente, mas levando ao mesmo resultado, a apoptose de hepatócitos também promove a etapa de iniciação de ativação das células estreladas, através do processo mediado por Fas ligante, que envolve ainda o Fator de Necrose Tumoral (TNF). As células de Kupffer

quando ativadas também contribuem para a estimulação de síntese de matriz, proliferação celular e perda de retinóides, através da ação de citocinas, especialmente o TGF- β 1 (Fator Transformador de Crescimento β 1) e espécies reativas de oxigênio. Além disso, as células endoteliais participam da conversão do TGF- β 1 latente para a forma ativa profibrogênica.

Perpetuação - Esta fase envolve não somente estímulos autócrinos como também parácrinos, e compreende eventos discretos que aumentam a deposição de matriz extracelular. Friedmann (2000) divide este processo em fases: proliferação, quimiotaxia, contractilidade, alteração de matriz, fibrogênese e perda de retinóides, conforme mostrado na Figura 03. Essa mudança no parênquima anteriormente normal resulta em uma “cicatriz” no tecido.

Uma das principais características da ativação de células estreladas é a perda de retinóides perinucleares. Guimarães et al., 2007 demonstraram que em cultura esses retinóides são estocados como retinil ésteres, mas são liberados como retinol, e estudos sugerem que acontece hidrólise intracelular de ésteres antes da exportação para o meio extracelular (Guimaraes et al. 2007).

O produto mais abundante no tecido hepático fibrótico é o colágeno tipo I. A produção desta substância pelas células estreladas é regulada por diversos parâmetros. Produtos da peroxidação lipídica atualmente são vistos como importantes estímulos para a produção de matriz extracelular e por isso diversas terapias visando combater as espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido estudadas.

Além disso, as propriedades proliferativas e quimiotáticas que as células estreladas adquirem ao se ativarem contribuem para a formação e a progressão da fibrose. Essas características são atribuídas a muitos fatores, como o PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), que é conhecido como sendo a citocina mais mitogênica e a que mais exerce ação quimiotática para estas células. Porém existem ainda outras moléculas envolvidas no

potencial mitogênico, entre eles o VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular) e o EGF (Fator de Crescimento Epidermal), entre outros. Muitas intervenções terapêuticas estão sendo estudadas com base nestes fatores (Yang et al. 2008).

Contudo, o maior determinante na progressão da fibrose é a falha na degradação da matriz extracelular. MMP1, ou Metaloproteinase de Matriz 1 é a principal protease que pode degradar colágeno I e é inativada por TIMPs (Inibidores de Metaloproteinases do Tecido). É necessário enfatizar que TIMP-1 é o principal inibidor de MMP-1 e é produzida pelas células estreladas. A contratibilidade das células estreladas quando ativadas, é um fator determinante na resistência vascular portal que ocorre na fibrose hepática (Gieling et al. 2008).

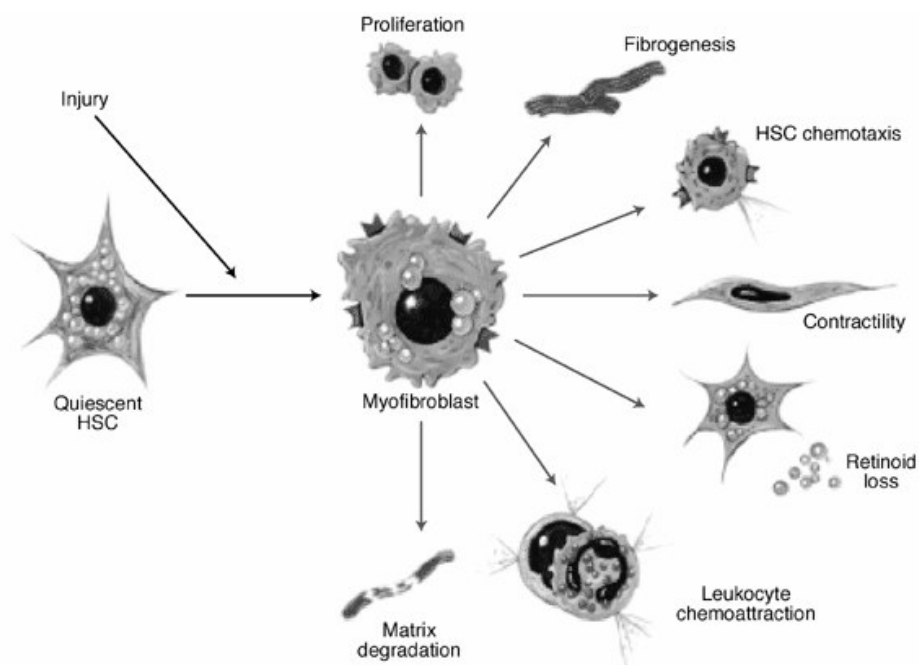


Ilustração 3: Transformação de célula estrelada em miofibroblasto. Após o dano, as células estreladas modificam-se fenotipicamente e iniciam uma série de eventos que contribuem para a progressão da fibrose. Adaptado de (Friedman 2000).

Resolução - Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem que as células estreladas podem reverter seu fenótipo, nenhum estudo comprovou que o mesmo acontece *in vivo*. Não está clara se a regressão da fibrose acontece quando as células estreladas sofrem apoptose ou se as células estreladas retornam ao fenótipo quiescente (Figura 04). Rastrear as células para confirmar se uma vez ativadas elas poderiam retornar ao estado quiescente poderá elucidar esta questão. Porém, há dados que suportam a idéia de que a apoptose é o evento mais importante para a regressão da fibrose. Em cultura as células estreladas fazem apoptose via TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Taimr et al. 2003) e estudos evidenciam que as células *Natural Killer* (NK) parecem estar envolvidas com a resolução da fibrose *in vivo*, uma vez que animais com deficiência de NK desenvolvem fibrose mais rapidamente. Clinicamente também é observado que a atividade das células NK é negativamente correlacionada com a fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica (Gao et al. 2007). Poynard *et al.*, 2003 ressaltam que em adultos a fibrogênese acelera com o aumento da idade do indivíduo e isso está de acordo com o declínio das funções das células NK com a idade (Poynard et al. 2003)

Oakley et al identificaram que o NFκB (Fator Nuclear Kappa Beta) é um importante mediador intracelular no processo de fibrogênese, induzindo a expressão de genes inflamatórios na célula ativada. Além disso, protege contra a apoptose através do aumento da expressão de um grande número de genes antiapoptóticos (Oakley et al. 2005). Assim, agentes que induzem a apoptose podem fazê-lo diminuindo o sinal intracelular de NFκB. Mas induzir apoptose através, por exemplo de substâncias químicas *in vivo*, deve ser feito de forma muito cautelosa. Como ressaltam Kisseleva e Brenner, enquanto a apoptose de miofibroblastos pode ser vantajosa na reversão da fibrose, a apoptose de hepatócitos é um fator pró-fibrogênico (Kisseleva and Brenner 2008).

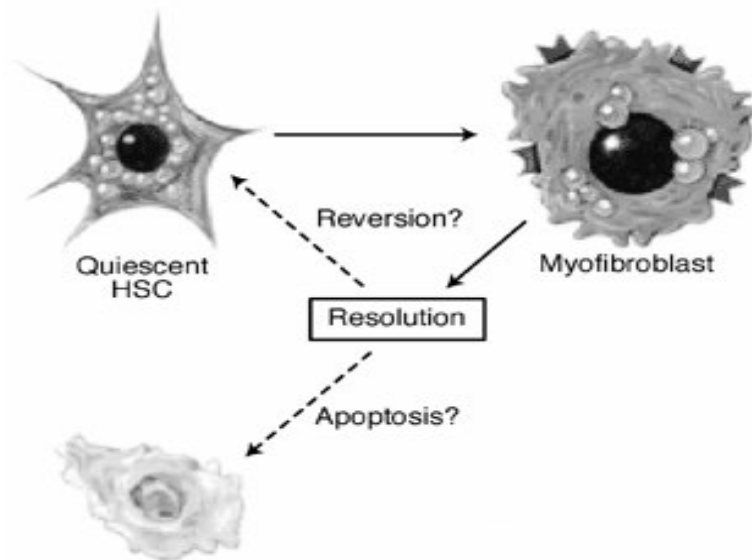


Ilustração 4: Resolução da fibrose hepática: O destino das células estreladas é incerto, mas deve incluir ou a reversão para o estado quiescente ou morte por apoptose (Adaptado (Friedman 2000)).

1.3.1. Fator Transformador de Crescimento $\beta 1$ e fibrose hepática

Durante os anos 70 muitos estudos foram realizados buscando definir fatores de crescimento que poderiam ter relação com células malignas. Em 1981 Anita Roberts e colaboradores em seu laboratório no Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos Americano (NIH), identificaram o Fator Transformador de Crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e definiram-na como uma molécula envolvida em sinais de processos biológicos (Roberts et al. 1983). Originalmente TGF- $\beta 1$ foi purificado de plaquetas e placenta humanas, e rim bovino, sendo caracterizado como um homodímero de 25 kDa, com duas cadeias de 112 aminoácidos unidas por pontes dissulfeto (Derynck et al. 1985). Após, foram purificadas outras formas da citocina, denominadas TGF- $\beta 2$ e TGF- $\beta 3$. As 3 isoformas existentes em mamíferos são

codificadas por genes diferentes, porém possuem uma cascata de sinalização comum (Roberts et al. 1991).

A superfamília TGF- β é integrada por mais 35 citocinas que incluem as ativinas, inibinas, proteínas morfológicas de osso e o fator de crescimento transformante propriamente dito. Este último regula uma grande quantidade de atividades biológicas como proliferação, migração e apoptose em diferentes tipos celulares, tanto no estado adulto como durante o desenvolvimento embrionário (Yan et al. 2009).

A citocina TGF- β 1 é considerada uma citocina pleiotrópica multifuncional, devido aos efeitos que tem sobre diferentes tipos celulares. Ao mesmo tempo em que age como inibidor da proliferação de células mielóides, mesenquimais, epiteliais, linfóides e de vários tipos de tumores, é estimulador da proliferação de fibroblastos. Em miofibroblastos é um estimulador da síntese de proteínas de MEC (Dooley et al. 2000).

A via de sinalização do TGF- β ocorre através da ligação a receptores transmembrana (Figura 05). Estes são complexos heteroméricos compostos por cadeias de tipo I e II de Serina / Treonina quinase (T β RI e T β RII). A ligação do TGF- β ao seu complexo receptor faz com que o T β RII fosforile o T β RI, o qual uma vez ativado se auto-fosforila e fosforila as proteínas alvo. Dentre elas, a família mais importante de mediadores da via de sinalização do TGF- β são as Smads. Smad 2 e 3 são diretamente fosforiladas pelo T β RI e formam um complexo com Smad4, o qual se transloca para o núcleo, regulando múltiplos genes efetores. Entre os genes ativados por TGF- β está Smad7, que age como um *feedback* negativo regulando a intensidade ou duração do sinal através da ligação com T β RI impedindo assim a fosforilação das Smads 2 e 3 (Gordon and Blobel 2008).

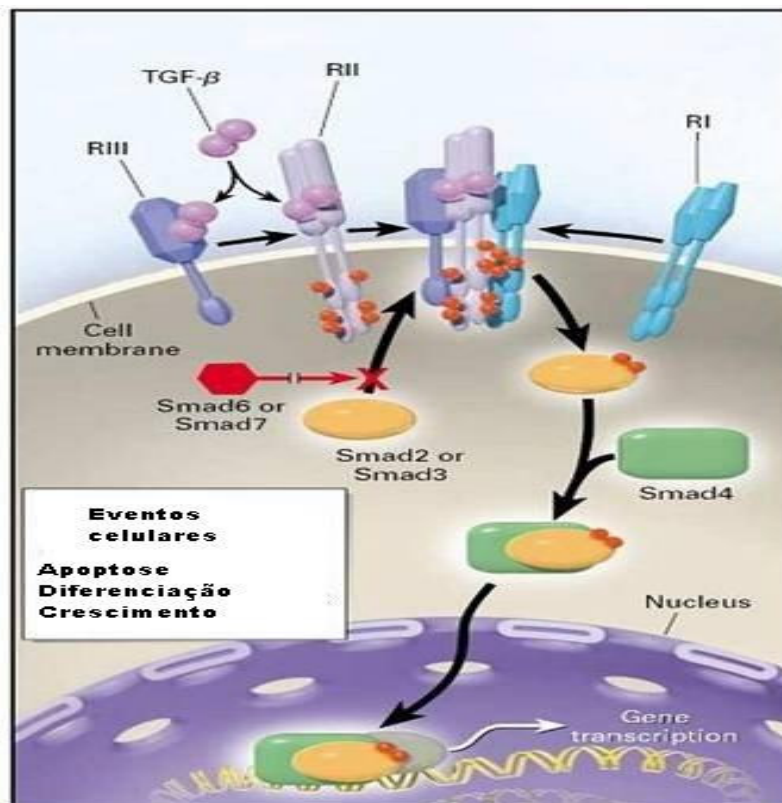


Ilustração 5 – Via de sinalização celular do TGF-β1 (Gordon and Blobe 2008)

No fígado, TGF-β1 é responsável pela diferenciação das células estreladas em miofibroblastos e por aumentar diretamente a síntese de MEC, inibir a expressão de collagenases teciduais e aumentar a produção de inibidores de enzimas que degradam matriz, como plasminogênio e metaloproteinases. Além de atuar como estimulante para mudança de fenótipo das células quiescentes para miofibroblastos de forma parácrina, também participa da posterior manutenção deste fenótipo através de alimentação autócrina positiva. Por esse motivo, é visto como um dos principais alvos terapêuticos para fibrose (Matsuzaki 2009) (Gressner et al. 2002); (Dooley et al. 2001).

Devido a este importante papel fibrogênese, por muito tempo acreditou-se que a quantificação de TGF- β 1 no soro poderia ter correlação com a intensidade da fibrose. Apesar de certos estudos encontrarem uma correlação positiva, esses achados não foram incorporados na rotina da investigação clínica (Flisiak et al. 2005, Kanzler et al. 2001, Neumann et al. 2008).

1.3.2. Linhagem de Célula Estrelada GRX

Existem muitas linhagens de células estreladas, tanto de origem humana (LI90, LX-1, LX-2, HSC 180) quanto de origem murina (HSC-T6, PAV-SV68c-IS, A640-IS, GRX), entre outras (Herrmann et al. 2007).

A linhagem imortal GRX é a mais antiga e foi obtida de fígado de camundongos C3H/HeN experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni* através de digestão enzimática do tecido hepático por Borojevic, et al. (1985) (Borojevic et al. 1985). As GRX derivaram de migração espontânea de granulomas fibróticos e apresentam morfologia de miofibroblasto. Secretam colágeno tipo I, II e IV, produzem laminina, fibronectina, e sintetizam glicosaminoglicanos, como heparitina (Herrmann et al. 2007). Tratamento com retinol ou indometacina induz a reversão de fenótipo, evidenciado pelo acúmulo de gordura, reorganização do citoesqueleto e indução do estado quiescente das células tratadas (Mermelstein et al. 2001).

1.4. Estratégias potenciais para a terapia anti-fibrótica.

Muitos avanços têm sido realizados no âmbito do entendimento do mecanismo de fibrogênese a partir dos quais novos alvos terapêuticos têm sido propostos (Friedman et al. 2007).

Até o momento, terapias que interfiram com a causa da doença representam as melhores opções de tratamento para a fibrose hepática. Além disso, inúmeras moléculas para atingir os mais diferentes alvos do processo de fibrogênese foram testadas *in vitro* e/ou *in vivo*. Várias delas têm como alvo a diminuição da ativação das células estreladas hepáticas, enquanto outras buscam inibir a sua proliferação ou induzir sua apoptose, incluindo estudos que inibem o TGF- β 1. A tabela 01 mostra diferentes estratégias antifibróticas em estudo nos últimos anos de acordo com (Fowell and Iredale 2006).

Tabela 1. Potenciais alvos para tratamento da fibrose hepática e estratégias terapêuticas utilizadas (Adaptado de (Fowell and Iredale 2006))

Alvo	Modalidade Terapêutica	Referência
Inflamação Hepática	Corticosteróides	(Mitchison et al. 1992)
	Colchicina	(Rambaldi and Gluud 2001)
	Antagonistas TNF	(Tilg et al. 2003)
	IL-10	(Nelson et al. 2003)
Inibição ativação das HSC	Antioxidante - Vitamina E	(Houglum et al. 1997). (de Oliveira et al. 2008)
	SNAC	
	IFN- λ	(Fowell and Iredale 2006)
	Anti- TGF- β 1	(Arias et al. 2003)
Inibição proliferação das HSC	Antagonistas de PDGF	(Zvibel et al. 2008)
Aumento da degradação de Matriz	MMPs	(Iimuro and Brenner 2008)
	uPA	(Zheng et al. 2005)
Apoptose de HSC	Gliotoxina	(Anselmi et al. 2007)

Legenda: TNF(Fator de Necrose Tumoral.), IL-10 (Interleucina 10), SNAC (S-nitroso-N-acetilcisteína), TGF- β 1 (Fator Transformador de Crescimento) ;PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), MMPs (Metaloproteinases De Matriz); uPA (Uroquinase Ativadora de Plasminogênio Humano)

Da mesma forma, diferentes estratégias de terapia gênica têm sido testadas para o tratamento da fibrose. Recentemente um estudo demonstrou que a injeção de DNA contendo o gene do fator de crescimento de hepatócitos humanos (HGF) através da artéria hepática reverteu a fibrose em cães e diminuiu a expressão de TGF- β 1 no fígado. A combinação de terapia celular com terapia gênica realizada por (Sun et al. 2008) também demonstrou diminuição da fibrose. Foram retiradas células tronco do parênquima hepático de animais com ligadura de ducto biliar e essas células foram transfectadas com adenovírus para o gene da uroquinase ativadora de plasminogênio humano (uPA) e transplantadas em ratos com cirrose induzida por CCl₄. Estes animais tiveram redução de áreas de fibrose hepática, bem como diminuição da produção de actina de músculo liso e TGF- β 1 em relação aos controles (Sun et al. 2008).

Tendo em vista que o aumento de muitas citocinas no parênquima hepático é o fator determinante para o início da fibrogênese, o uso da ferramenta RNA de Interferência (RNAi), que promove o silenciamento gênico, é promissor para o tratamento da fibrose hepática. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com esta abordagem com resultados animadores em modelos animais. Através de injeção hidrodinâmica, ratos com fibrose induzida por dimetilnitrosamina ou por ligadura de ducto biliar receberam pequenas moléculas de RNA interferente (siRNA) para PDGFR (Receptor do Fator de Crescimento de Plaquetas), o que diminuiu a fibrose em ambos os modelos (Chen et al. 2008). Em outro estudo RNAi para TIMP-2 injetado pela veia da cauda atenuou a fibrose hepática em modelo murino de cirrose (Hu et al. 2007).

A ferramenta RNA de interferência será abordada no artigo de revisão que segue.

1.4.1. Artigo 1- Atualizando o Código Genético: O RNA de Interferência um comentário sobre o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2006

2. JUSTIFICATIVA

A resposta a um dano continuado envolve um estágio inicial de ativação e outro de perpetuação do processo. A gama crescente do conhecimento da participação de citocinas e seus receptores, além de subconjuntos de células inflamatórias, têm expandido ainda mais os estudos sobre este dinâmico processo. É através da observação do conjunto de eventos que ocorrem durante a fibrogênese hepática que novas terapias serão implantadas favorecendo a saúde de milhões de crianças e adultos com fibrose pelas mais diversas causas (Friedmann et al., 2008; Dan Li, 1999).

3. HIPÓTESE

A hipótese testada neste trabalho é de que o TGF- β 1 poderia ser um alvo para terapias anti-fibrogênicas e que a sua diminuição levaria à reversão do fenótipo de células estreladas hepáticas ativadas.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vivo*, o comportamento do TGF- β 1 no desenvolvimento da fibrose hepática e verificar, *in vitro*, o efeito da sua diminuição em células estreladas hepáticas ativadas.

4.1. Objetivos específicos

Modelo Murino

- Analisar a relação dos níveis séricos de TGF- β 1 com a densidade de colágeno no tecido hepático em modelo murino de cirrose por Tetracloreto de Carbono.

Pacientes com Atresia de Vias Biliares Extra-hepáticas

- Avaliar os níveis séricos e a expressão tecidual de TGF- β 1 em pacientes com Atresia Biliar no momento do diagnóstico e ao transplante, correlacionando com a densidade de colágeno no tecido hepático e com marcadores séricos da doença (APRI e contagem de plaquetas).

Linhagem Celular GRX

- Avaliar o efeito do tratamento de células estreladas hepáticas com Anfotericina B sobre os níveis de TGF- β 1 e sua reversão ao fenótipo quiescente.

- Avaliar o efeito do silenciamento da expressão de TGF- β 1 com o uso de RNA de interferência em células estreladas hepáticas *in vitro*.

RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados sob a forma de 4 artigos científicos.

5.1. Artigo 2 - Relação entre TGF β 1 sérico e densidade de colágeno no tecido de ratos tratados com Tetracloreto de Carbono.

5.2. Artigo 3 - Relationship between serum TGF- β 1 and collagen density in liver tissue of rats receiving Carbon Tetrachloride

5.3. Artigo 4 - Amphotericin B decreases TGF- β 1 in GRX cells, a model of activated myofibroblasts

5.4. Artigo 5 - Transient transfection of shRNA using cationic lipids in a cell line of hepatic stellate cells

ARTIGO - 02**Relação entre TGF - β 1 sérico e densidade de colágeno no tecido de ratos tratados com Tetracloreto de Carbono.**

Comunicação Breve a ser submetida ao periódico *Arquivos de Gastroenterologia*

Fernanda Oliveira², Bárbara Grossmann¹, Themis R. Silveira^{1,2}, Ursula Matte^{1,2}

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP-90035-903 Brazil

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP-90035-903 Brazil

ABSTRACT

Na fibrose, a matriz extra-celular do fígado torna-se predominantemente composta por colágeno. É sabido que o TGF- β 1 atua diretamente no balanço de síntese e degradação desta molécula. O uso crônico de Tetracloreto de Carbono (CCl_4) em ratos para induzir cirrose é um modelo bem estabelecido. Neste estudo buscamos avaliar a correlação entre os valores séricos de TGF- β 1 com a densidade de colágeno no tecido hepático durante o processo de fibrogênese. Para isso ratos Wistar foram submetidos ao modelo de indução de cirrose por CCl_4 . Nos tempos 0, 6, 10, 12 e 16 semanas foram coletados soros e amostras de fígado. O TGF- β 1 sérico foi dosado pelo método de ELISA e a quantificação da densidade de colágeno no fígado por análise histológica em lâminas coradas com picrossírius. A correlação entre os níveis séricos de TGF- β 1 e a densidade de colágeno foi de -0,48 ($p < 0,05$). Como em outros estudos, a expressão de TGF- β 1 está aumentada e foi observada sua redução nos estágios finais da fibrose. A formação de nódulos regenerativos e o aumento da densidade de colágeno no fígado sugerem que a diminuição da concentração sérica seja por redução da permeabilidade venosa do fígado neste modelo

Introdução

A fibrose resulta tipicamente de uma inflamação crônica, definida como uma resposta imune persistente, na qual remodelagem de tecido e processos de cicatrização ocorrem simultaneamente. Durante a progressão da fibrogênese e o estabelecimento da cirrose, a matriz extra-celular do fígado torna-se predominantemente composta por colágeno.(1) O TGF- β 1 é uma citocina pleiotrópica intimamente envolvida na fibrogênese. Além de participar da ativação das células estreladas também atua diretamente no balanço entre síntese e degradação de colágeno, podendo contribuir para o aumento da matriz extra-celular (2). Dentre os vários modelos de indução de cirrose em animais, o uso crônico de Tetracloreto de Carbono (CCl₄) em ratos está bem estabelecido, inclusive quanto à velocidade de progressão da fibrose. O mecanismo de ação do CCl₄ ocorre através da peroxidação lipídica (3).

Neste estudo o modelo de CCl₄ via oral foi utilizado para avaliar a correlação entre os valores séricos de TGF- β 1 com a densidade de colágeno durante o período de 16 semanas, que corresponde ao processo de fibrogênese neste modelo com estabelecimento de cirrose.

Material e métodos

Foram estudados 25 ratos Wistar machos submetidos ao modelo de indução de cirrose por Tetracloreto de Carbono segundo descrito por Goldani et al. (2005) (3). Os animais foram sacrificados ao longo do experimento nas semanas 0, 6, 10, 12 e 16 (n = 5 por grupo). Ao sacrifício foi coletado sangue para dosagem de sérico pelo método de ELISA (Kit R&D Systems), segundo instruções do fabricante. Os fígados foram retirados e submetidos a análise histológica com coloração picrosírius. Para quantificação da densidade de colágeno, imagens de 5 campos aleatórios foram capturados com aumento de 200X. A análise morfométrica foi realizada conforme descrito por (4)(2004) no sistema Image-ProTMPlus versão 4.1 (Media Cybernetics).

Resultados

Os níveis séricos de TGF- β 1 de apresentaram uma elevação nas primeiras 10 semanas de tratamento (figura 1), com pico máximo de expressão na sexta semana, quando a deposição de colágeno ainda era inferior a 20% (figura 2B). Nas semanas seguintes a deposição de colágeno no tecido continuou aumentando (figuras 2C e 2D), enquanto os níveis séricos da citocina diminuíram ainda mais (figura 1). Foi possível detectar uma correlação inversa entre os níveis séricos de TGF- β 1 e densidade de colágeno (-0,48; $p < 0,05$).

Discussão

O modelo experimental de fibrogênese por CCl₄ mimetiza a fibrose alcoólica em humanos e é um excelente modelo para o estudo do dano hepático por toxicidade crônica (5). Como em muitos outros modelos de fibrose hepática, a expressão de TGF- β 1 está aumentada (5) e sua inibição com *small interfering* RNA (siRNA) marcadamente reduz a fibrose (6). Porém a cinética dessa citocina em soro não foi estudada até o momento. Foi observada uma marcada redução no nível sérico de TGF- β 1 nos estágios finais da progressão da fibrose. Esta diminuição pode ser devida a diferentes fatores, entre eles a diminuição da expressão de TGF β 1 no tecido ou, por outro lado, a diminuição da sua liberação para a circulação devido à redução da permeabilidade venosa do fígado. Nakatsukasa et al. (1990) estudaram a expressão tecidual de TGF- β 1 no fígado de animais tratados por CCl₄ durante 12 semanas e observaram flutuações nos níveis de expressão ao longo do tempo mas sem uma tendência definida (7). Neste modelo, na 16a semana os animais apresentam cirrose estabelecida, com

formação de nódulos regenerativos e aumento da densidade de colágeno. Esses fatores, aliados à observação de Nakatsukasa et al. (1990), sugerem que a diminuição da concentração sérica seja por redução da permeabilidade tecidual neste modelo. (8). De qualquer maneira essa observação é importante pois indica que a concentração sérica de TGF β_1 deve ser utilizada com cautela como um marcador não invasivo do processo de fibrogênese no modelo animal de cirrose por CCl₄.

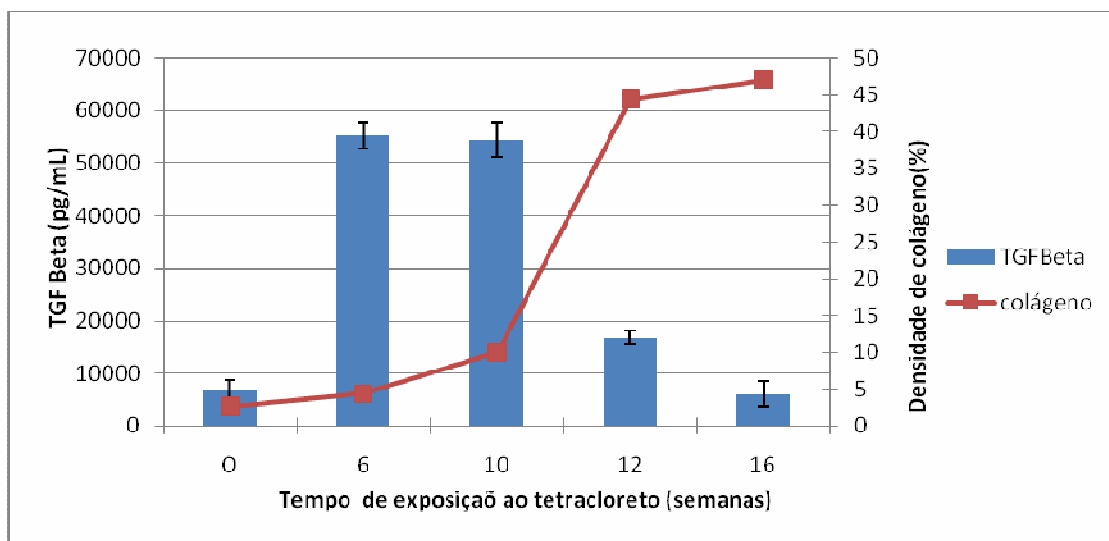


Figura 1: Médias das quantidades de TGF β 1 sérico (ng/mL) e a densidade de colágeno

(%) expressos nos diferentes tempos de tratamento com tetracloreto de carbono.

(n=5 animais/tempo).

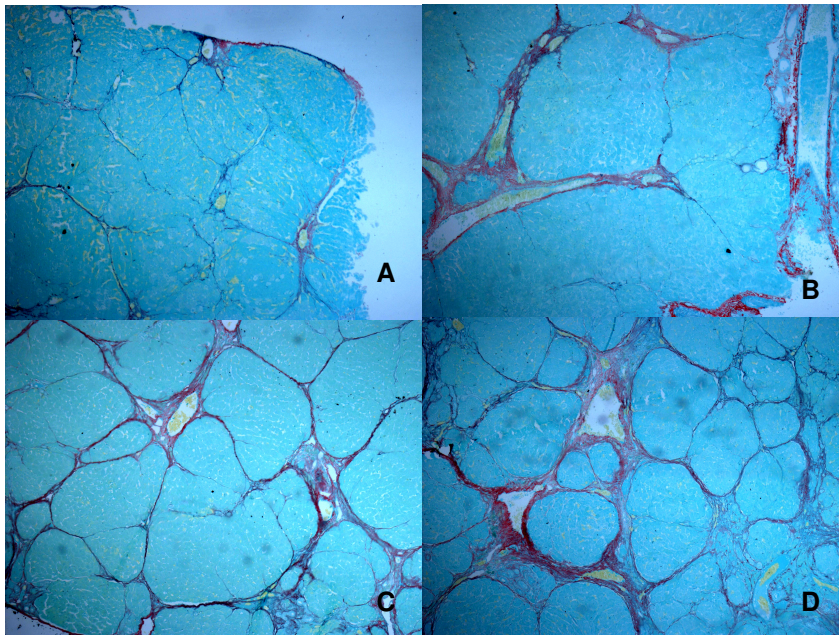


Figura 2: Corte histológico do tecido hepático de animais tratados com Tetracloreto de carbono corados com Picosírius: **A)** 6 semanas, **B)** 10 semanas **C)** 12 semanas, **D)** 16 semanas. 200X

Referências Bibliográficas

1. Wynn TA 2008 Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199-210.
2. Bataller R, Brenner DA 2005 Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115:209-218.
3. Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR 2007 The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol* 58:331-337.
4. Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Del Moral RM, Perez-Milena A, Del Moral RG 2000 Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J Hepatol* 32:453-464.
5. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW 2007 Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol* 45:43-50.
6. Kim KH, Kim HC, Hwang MY, Oh HK, Lee TS, Chang YC, Song HJ, Won NH, Park KK 2006 The antifibrotic effect of TGF-beta1 siRNAs in murine model of liver cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1072-1078.

7. Nakatsukasa H, Evarts RP, Hsia CC, Thorgeirsson SS 1990 Transforming growth factor-beta 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. *Lab Invest* 63:171-180.

8. Nakatsukasa H, Nagy P, Evarts RP, Hsia CC, Marsden E, Thorgeirsson SS 1990 Cellular distribution of transforming growth factor-beta 1 and procollagen types I, III, and IV transcripts in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 85:1833-1843.

ARTIGO - 03

Artigo a ser submetido ao Periódico: *Journal of Pediatric Surgery*

Serum and tissue TGF- β 1 in children with Biliary Atresia

Fernanda dos Santos de Oliveira², Carlos Kieling¹, Jorge Luiz dos Santos¹, Patrícia Ponce de Leon Lima², Sandra Vieira¹; Themis Reverbel da Silveira^{1,2}, Ursula Matte,^{1,2}.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP-90035-903 Brazil

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP-90035-903 Brazil

ABSTRACT

Biliary atresia (BA) is an infantile disorder characterized by the obstruction of a portion or the entirety of the extrahepatic bile ducts, leading to hepatic fibrosis and loss of liver function. The gold standard for diagnosing and grading fibrosis is liver biopsy, but there are many groups searching for non invasive biomarkers that could replace and/or complement this procedure. In this study we evaluated serum and tissue TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1) and APRI (AST-to-Platelet Ratio Index) in patients with BA at the time of diagnosis and at liver transplantation, and correlated these data with tissue collagen density, in order to verify if they could act as biomarkers for BA.

At the time of diagnosis TGF- β 1 levels were highly variable in BA patients. However serum values at transplantation were significantly decreased (13.55 ± 3.99 ng/mL) as compared to controls ($41.55\text{ng/mL} \pm 7.9\text{ng/mL}$, $p=0.01$). No correlation was found between serum TGF- β 1 and collagen density in both groups analyzed.

Serum TGF- β 1 showed no correlation with APRI at diagnosis. At the time of liver transplantation all patients had low serum TGF- β 1 and variable APRI, although all higher than 2.0. However, when platelet count was used, an inverse correlation with serum TGF- β 1 was observed at the time of diagnostics ($r^2=0.749$ $p=0.03$).

We suggest that TGF- β 1 levels at the time of diagnostics associated to platelet count can be useful to assess prognosis, however it has to be confirmed in a larger number of patients.

Introduction

Biliary atresia (BA) is an infantile disorder characterized by the complete obstruction of a portion or the entirety of the extrahepatic biliary ducts. The lapse of time between Kasai procedure and native liver failure is variable; it may occur within 2 years if surgery is ineffective or not performed, or after many years of compensated biliary cirrhosis (1). The development of hepatic fibrosis in biliary atresia is more aggressive than in any other adult disorder. Many factors can influence the disease progression rate.(2)

Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) is one of the main profibrotic cytokine involved in hepatic fibrosis, inducing differentiation of hepatic stellar cells (HSC) into myofibroblasts (MFB). The activation of HSC leads to increased production of collagen, proteoglycans, structural glycoproteins and hyaluronic acid (3).

The gold standard for diagnosing and grading fibrosis is liver biopsy, but there are many groups searching for non invasive biomarkers that are less invasive and could replace and/or complement liver biopsy Gressner et al. (2007) divide the serum fibrosis markers into two categories. Class I markers comprise mainly secretion products of activated HSC and portal MFB and reflect the disrupted extracellular matrix turnover (e.g. TGF- β 1, Hyaluronic Acid, etc). Class II markers comprise a variety of biochemical scores which are selected by various statistical models and mathematical algorithms, like Fibrotest and APRI (AST-to-Platelet Ratio Index)(4). The latter is a test based on the ratio between AST (aspartate aminotransferase) and platelet count that showed high accuracy in predicting both significant fibrosis and cirrhosis in adult patients with chronic hepatitis C (5). However, there are few reports regarding the non invasive biomarkers of fibrosis in children with chronic liver disease (6).

In this study we tested a class I (TGF- β 1) and a class II biomarker (APRI) in two groups of patients at two stages of biliary atresia: at the time of diagnosis and at liver transplantation, comparing with tissue collagen density.

Material and Methods

Patients

Liver biopsies were obtained from 14 patients with biliary atresia (BA). BA diagnosis was based on standard clinical laboratory, radiological and histological findings. In 8 cases (mean age 72 ± 18.71 days) the specimens were obtained by surgical biopsy before Kasai procedure. Specimens from the other 6 cases were obtained from the liver explants (mean age 316 ± 68.53 days). Blood samples were collected between 1 week and 1 month before procedure (for liver biopsy and transplantation, respectively) for routine biochemical investigation. Samples were kept at -80°C until TGF β 1 quantification.

Blood samples from four children without liver disease or any inflammatory disorders (mean age 536 ± 309 days) attending the hospital were used as control for TGF β 1 levels.

TGF- β 1 Quantification

All sera were centrifuged at 3000 g within 30 min of collection and frozen at -80°C . A sandwich ELISA for TGF- β 1 (Duo Set ELISA R&D, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. Results were calculated on a standard curve and multiplied for the dilution factor.

TGF- β 1 Immunohistochemistry

Wedge liver biopsies obtained during diagnosis procedure or explant specimens were stained with rabbit anti-TGF β 1 primary antibody (Santa Cruz, California, USA) (1:50). and the method was taken with the kit Picture Max (Zimed, Invitrogen, Carlsband, USA) .

Formalin-fixed paraffin-embedded liver specimens were used. Biopsies were taken from the anterior margin of segment IV using standard methods.

Surface Collagen Density

Liver slides were stained with Picrosirius red and 5 images were captured from randomly chosen 200X fields. Collagen density was defined as the mean values of collagen percentage in 5 liver images, quantified by the morphometric method described by Masseroli et al., 2000 (7). Briefly, the images were captured in a physical device in TIFF format. The morphometric analysis, conducted on a computerized imaging system, allowed for the automatic quantification of the fibrotic area present in the surface fields .The analysis of the image was made with Image-ProTMPlus version 4.1 software (Media Cybernetics).

AST Platelet Ratio Index -APRI

Values for AST and platelet count were obtained from the patient's charts, as these tests are performed along with the routine biochemical tests.

APRI was performed according to Wai et al., 2003, with the following formula:

$$\text{APRI} = \frac{\text{AST} / \text{upper limit of normal (ULN)}}{\text{Platelets (x10}^9\text{/l)}} \times 100$$

The upper normal limit considered for AST was 40, based on the laboratory reference values.

Statistics

Findings were expressed as mean \pm SD and compared using Student's T test or ANOVA followed by the Tukey procedure. Correlations were evaluated using Pearson's test.

Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp, Redmond, WA) and SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) were used for data processing and statistical analysis.

Results

Serum TGF- β 1

First we evaluated TGF β 1 levels in the serum of patients with BA at the time of diagnosis and at the time of liver transplantation, comparing with those from normal children. At the time of diagnosis TGF β 1 levels were highly variable, ranging between 90 ng/ml and 10.57 ng/ml (44.60 ± 33.49 ng/ml), as shown in figure 1. At the time of transplantation, BA patients had serum TGF β 1 levels significantly decreased (13.55 ± 3.99 ng/ml) as compared to controls ($41.55 \text{ ng/mm} \pm 7.9 \text{ ng/mm}$) ($p=0.01$).

APRI

Since APRI was calculated as a class II marker useful as an insight on the patient's clinical conditions, it was only calculated for BA patients. At the time of diagnosis it ranged between 0.4 and 1.9 (1.27 ± 0.46), and at the time of transplantation it was increased to values between 1.7 and 14.6 (8.08 ± 5.68) ($p=0.05$).

TGF- β 1 in the Tissue

The expression of TGF- β 1 was assessed in liver tissue by immunohistochemistry. At the time of diagnosis, most patients stained positively for TGF- β 1 whereas liver explants were all negative, except for one patient. Moreover, marked TGF- β 1 expression was observed in hepatocytes at the time of diagnostics, as shown on figure 2.

Collagen Density

Collagen density was used as a quantitative measure of liver fibrosis and at the time of diagnosis it was $20.12\% \pm 8.41\%$, whereas at the time of transplant it was $38.13\% \pm 14.61\%$. Despite the expectation that patients undergoing liver transplantation would have higher values than patients at the time of diagnostics, no statistically significant difference was found between the two groups.

Serum TGF- β 1 as a surrogate marker of liver disease

Serum TGF- β 1 showed no correlation with APRI. At the time of diagnosis, all patients had APRI lower than 2.0 while serum TGF- β 1 was below 25 ng/mL in four patients and higher than 50 ng/mL in the other four. At the time of liver transplantation all patients had low serum TGF- β 1 (13.55 ± 3.99 ng/ml) and variable APRI, although all higher than 2.0 (Figure 3A).

However, if platelet count is used, an inverse correlation with serum TGF- β 1 is observed at the time of diagnostics ($r^2=0.749$ $p=0.03$). At the time of liver transplantation all patients had low TGF- β 1 and platelet count below 150,000/uL (Figure C).

No correlation was found between serum TGF- β 1 and collagen density, even considering all patients as a single group ($r^2=0.16$, $p=0.3$) (Figure 3B)

Discussion

TGF- β 1 is widely regarded as pro-fibrogenic cytokine in liver injury (8). It exists in mammals as three isoforms (TGF- β 1, - β 2 and - β 3), which have very similar properties (9). However, the isoform TGF- β 1 has been described as the most important in the fibrogenic process by its ability to transform quiescent cells into activated collagen-producing myofibroblasts. Because of its important role in fibrogenesis, TGF- β 1 has been considered a potentially useful biomarker of fibrosis and cirrhosis, but results using this cytokine are controversial (10-12).

In this study we evaluated serum and tissue TGF- β 1 in patients with BA at the time of diagnostics and at liver transplantation. As serum TGF- β 1 values are inversely correlated with age in healthy children it is important to point out that there was no significant difference of age in patients at the time of liver transplantation and controls in our study. However, patients at the time of diagnosis were significantly younger than the other groups. However, in theory all three groups are comparable because the decrease in TGF- β 1 levels is more marked after five years of age (12).

No difference was found in serum TGF- β 1 values at the time of diagnostics as compared to controls or patients at the time of transplant, due to the wide variation observed in this group. However, a marked decrease in serum TGF- β 1 levels was observed in the patients at the time of transplant.

In order to evaluate the reasons for such decline, that could include decreased production or release, and/or increased clearance or catabolism, we analyzed liver biopsies at the time of diagnostics and liver explants. In liver explants, almost no expression of TGF β 1 was seen by immunohistochemistry, whereas variable expression was observed in liver biopsies, but most samples had positive staining of medium intensity.

Our findings are in agreement with Rosensweig et al. (1998) that studied TGF- β 1 in plasma and tissue of children with BA. In plasma, TGF β 1 levels in 9 children with BA undergoing liver transplantation were lower than the values of controls (12). Analysis of liver biopsies and explants showed increased expression of TGF β 1 in BA as compared with other causes of liver diseases. However, no correlation between plasma and tissue levels was observed, even though in the sample of Rosensweig et al. (1998) plasma and tissue samples were from different subjects.

The lack of expression of TGF- β 1 in liver explants is in agreement with Ahmed et al. (2000) that studied BA patients with early and late stage fibrosis. They noted a global decrease of TGF β 1 in late stage BA by immunohistochemistry (13). Lee et al. (2008) on the other hand, found an increase in TGF- β 1 mRNA levels in liver explants compared to biopsies obtained at Kasai procedure (14).

It is noteworthy that in our study, cells positive for TGF- β 1 staining were clearly hepatocytes, except for one patient with faint bile duct positive staining. Ahmed et al. (2000) found marked TGF- β 1 staining in spindle-shaped cells that could represent activated myofibroblasts (13). In our case, bile duct plugs may have made difficult to visualize positive myofibroblasts but, as seen in figure 2, hepatocytes are expressing TGF β 1 at the time of diagnosis. This observation suggests that hepatocytes may play a role in fibrogenesis, as

Kaimori et al.(2007) recently showed that hepatocytes treated with TGF β 1 in culture express collagen (15).

In order to use a clinically relevant surrogate marker to stage the liver disease, we chose APRI. All individuals at the time of transplantation had APRI greater than two and at the time of diagnosis it was less than two. Moreover, the four patients with lower TGF β 1 levels at the time of diagnosis had mean APRI of 1.1 (\pm 0.4) whereas the ones with higher TGF β 1 levels had mean APRI of 1.6 (\pm 0.2) which is consistent with marked fibrosis – and therefore maximum TGF β 1 activity (5, 13).

One important finding of this work is that there is no direct correlation between serum TGF β 1 and platelet count, thus indicating that the major source of TGF- β 1 in our patients was not platelet-derived. Rosensweig et al. (1998) also found that plasma TGF- β 1 levels were independent of PF4 (platelet factor 4), thus indicating that TGF- β 1 decrease is not secondary to thrombocytopenia.

At the time of liver transplantation patients are relatively homogenous: low platelet count, low serum TGF β 1, almost no TGF β 1 in the tissue, APRI elevated and high collagen density. This reflects end stage liver disease and does not account for the individual pathway that each patient took to get there. On the other hand, at the time of diagnostics patients can be divided in two groups, one with TGF β 1 higher than 50 ng/mL, and the other with TGF β 1 lower than 25 ng/mL. Interestingly, patients with lower TGF- β 1 seem to have a better outcome than those with higher TGF β 1 at the time of diagnosis (data not shown). As TGF β 1 at this point had an inverse correlation with platelet count, this indication may be related to a higher platelet count rather than to a lower TGF- β 1. This finding suggests that BA patients could be followed by the relation platelet count/ TGF- β 1.

This variation in patients at the time of diagnostics may reflect the fact that diagnosis is performed in patients with different stages of liver disease. Because there is more than one etiology for biliary atresia, some children may have the initial process *in utero*, while others will develop the disease at birth (16). Although no patient in our sample presented associated extra-hepatic malformations which are usually related to the *in utero* forms of biliary atresia, it is not possible to determine for how long the disease was active in our patients prior to diagnosis.

The analysis of liver biopsies could provide an indication for the duration of disease, despite the individual variability in response to liver injury (17). Although among our patients the three with more pronounced fibrosis (measured by collagen density) were the oldest, no clear correlation between TGF β 1 and histology could be made.

The usefulness of serum TGF β 1 as a surrogate marker of liver disease in children with BA is hard to evaluate due to the small number of patients analyzed in most studies. Our suggestion that TGF β 1 levels at the time of diagnostics associated to platelet count can be useful to assess prognosis has to be confirmed in a larger number of patients.

In BA patients at the time of liver transplantation, TGF- β 1 is lower than normal values. The lack of TGF- β 1 may have important consequences for the patient since it is a pleiotropic molecule, responsible for many functions in the body, mainly those related to immune response and cell growth(18) .Such effects are hard to determine, as TGF- β 1 function depends on the context in which it is (19). The association of liver disease with hepatocellular carcinoma and immunosuppression, although derived from many complex factors, may be also connected with low TGF- β 1 levels given its pivotal role in all aspects of inflammation, immune surveillance and neoplasia (20).

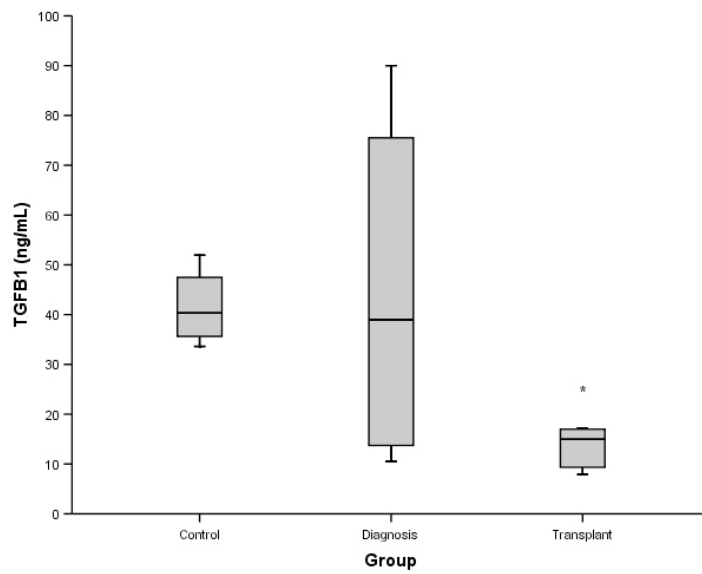


Figure 1: Comparison of serum TGF β 1 levels between BA patients at the time of diagnosis (n= 8), at liver transplantation (n=6), and normal children (n=3)

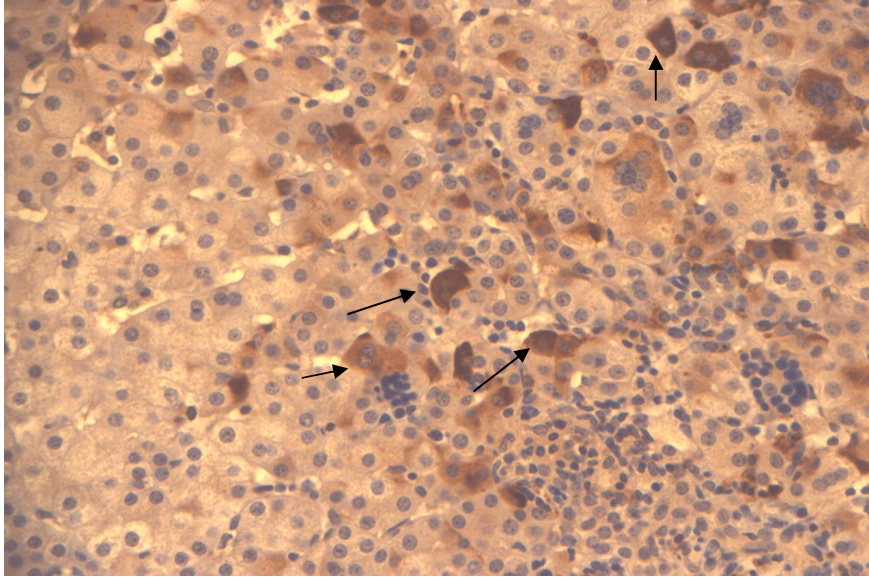


Figure 2: Fotomicrograph of a liver biopsy of a patient with Biliary Atresia at the time of diagnostics. Immunohistochemistry for TGF- β 1 showing positive hepatocytes (arrows) in livers from BA patient at diagnostic. 400X

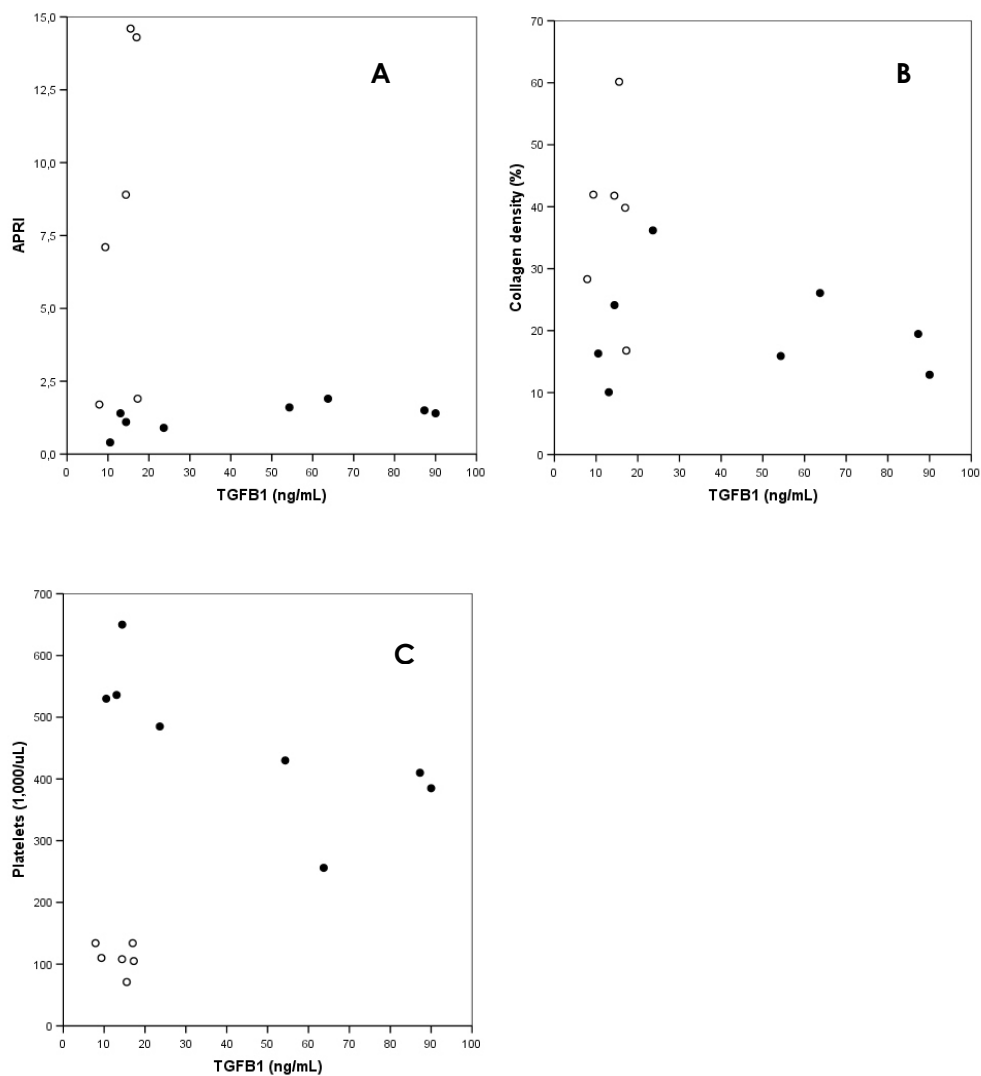


Figure 3: Serum TGF-β1 correlation with: A: APRI; B: collagen density; C: platelet count, in patients with Biliary Atresia at the time of diagnosis (filled circles) and at liver transplantation (empty circles).

References

1. Santos JL, Kieling CO, Meurer L, Vieira S, Ferreira CT, Lorentz A, Silveira TR 2009 The extent of biliary proliferation in liver biopsies from patients with biliary atresia at portoenterostomy is associated with the postoperative prognosis. *J Pediatr Surg* 44:695-701.
2. de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA 2007 Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *J Pediatr (Rio J)* 83:105-120.
3. Friedman SL 2008 Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 254:120-129.
4. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM 2007 Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 381:107-113.
5. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS 2003 A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:518-526.

6. de Ledinghen V, Le Bail B, Rebouissoux L, Fournier C, Foucher J, Miette V, Castera L, Sandrin L, Merrouche W, Lavrand F, Lamireau T 2007 Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 45:443-450.
7. Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Del Moral RM, Perez-Milena A, Del Moral RG 2000 Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *J Hepatol* 32:453-464.
8. Bissell DM 2001 Chronic liver injury, TGF-beta, and cancer. *Exp Mol Med* 33:179-190.
9. Massague J, Chen YG 2000 Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14:627-644.
10. Neumann S, Kaup FJ, Beardi B 2008 Plasma concentration of transforming growth factor-beta1 and hepatic fibrosis in dogs. *Can J Vet Res* 72:428-431.
11. Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska M, Kaczmarek M, Werpachowska I, Sienkiewicz J 2004 Serum concentration of transforming growth factor (TGF)-beta 1

does not predict advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 51:229-233.

12. Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, Schwarz KB 1998 Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res* 44:402-409.
13. Faiz Kabir Uddin Ahmed A, Ohtani H, Nio M, Funaki N, Iwami D, Kumagai S, Sato E, Nagura H, Ohi R 2000 In situ expression of fibrogenic growth factors and their receptors in biliary atresia: comparison between early and late stages. *J Pathol* 192:73-80.
14. Lee SY, Chuang JH, Huang CC, Chou MH, Wu CL, Chen CM, Hsieh CS, Chen CL 2004 Identification of transforming growth factors actively transcribed during the progress of liver fibrosis in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 39:702-708.
15. Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A 2007 Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 282:22089-22101.

16. Balistreri WF, Bezerra JA, Jansen P, Karpen SJ, Shneider BL, Suchy FJ 2005 Intrahepatic cholestasis: summary of an American Association for the Study of Liver Diseases single-topic conference. *Hepatology* 42:222-235.
17. Richardson MM, Powell EE, Barrie HD, Clouston AD, Purdie DM, Jonsson JR 2005 A combination of genetic polymorphisms increases the risk of progressive disease in chronic hepatitis C. *J Med Genet* 42:e45.
18. Matsuzaki K 2009 Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 14:2923-2934.
19. Kim IY, Kim MM, Kim SJ 2005 Transforming growth factor-beta : biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol* 38:1-8.
20. Gressner AM, Weiskirchen R 2003 The tightrope of therapeutic suppression of active transforming growth factor-beta: high enough to fall deeply? *J Hepatol* 39:856-859.

Artigo- 04**Submetido ao periodico Life Sciences****Amphotericin B decreases TGF- β 1 in GRX cells, a model of activated myofibroblasts**

Fernanda dos Santos de Oliveira^{1, 2,3}, Barbara Grossmann¹, Carolina Uribe^{1,3}, Guilherme Baldo^{1,4}, Valeska Lagranha^{1,5}, Themis Reverbel da Silveira^{1,2,3}, Ursula Matte^{1,2,3*}

1- Gene Therapy Center, Research Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2- Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory, Research Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

3- Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

4- Post-Graduation Program on Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

5- Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author.

Running title

Amphotericin B decreases TGF- β 1

Abstract: AIMS: Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β 1) is the main cytokine in the hepatic stellate cell (HSC) activation, and it's a first step in the hepatic fibrogenic process. TGF- β 1 is released primarily from Kuppfer cells although active stellate cells secrete large amounts of this cytokine, thus providing a positive feedback loop in hepatic fibrogenesis. Amphotericin B (AmB) is a polyene macrolide antibiotic widely used for treating systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. Evidence demonstrates the patients treated with a liposomal form of AmB for Visceral Leishmaniosis presented negligible levels of TGF- β 1. The aim of this study is to investigate the AmB action in the GRX cell, a model of mouse activated HSC. MAIN METHODS: The effects of AmB on the GRX and HepG2 cells are examined by using MTT test, Real-time PCR, ELISA, Wound Healing assay and staining of lipids by oil red. KEY FINDINGS: We document that AmB decreases TGF - β 1 expression at protein and mRNA levels, and significantly stimulates the intracellular lipid accumulation in GRX cell. SIGNIFICANCE: Our results provide novel insights into the action of Amb in the TGF - β 1 in addition to a possible reversion to a lypocyte phenotype and the impaired wound healing in GRX cells, suggest a potential anti-fibrogenic effect of AmB. However, in vivo studies shall be conducted to test this hypothesis.

Keywords

Amphotericin B, TGF- β 1, GRX cells, liver fibrosis, hepatic stellate cells

Introduction

Continuous liver injury can lead to changes in the extracellular matrix (ECM) resulting in a pathological state known as fibrosis (Friedman, 2008). Hepatic stellate cells (HSC), also known as lipocytes, Ito cells, or liver fat storing cells, have an important role in this process, increasing the ECM production. HSC are located in the perisinusoidal space of Disse, where they function as vitamin A storing cells and regulate hepatic blood flow (Xu, 2005). Among the diverse stimuli of stellate cells, Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) plays a central role in liver fibrogenesis promoting the transdifferentiation of HSC into Myofibroblasts (MFB) (Gressner and Weskirchen, 2005). In the first steps of HSC activation, TGF- β 1 is released primarily from Kupffer cells although active stellate cells secrete large amounts of this cytokine, thus providing a positive feedback loop in hepatic fibrogenesis (Matsusaki 2009).

It is not clear whether the reversal of fibrosis occurs when activated HSC undergo apoptosis or if they return to their quiescent phenotype. There is much evidence supporting the idea that apoptosis via Trail (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand) is an important event for the reversal of fibrosis (Tang X. et al 2009). However, inducing apoptosis through, for example chemical agents, in vivo, must be done in a very cautious way because while the apoptosis of myofibroblasts may be beneficial in the reversal of fibrosis, apoptosis of hepatocytes appears to be a factor pro-fibrogenic factor (Canbay A. et al 2004).

Amphotericin B (AmB) is a polyene macrolide antibiotic widely used for treating systemic fungal infections. AmB binds preferentially to ergosterol, a major component of the fungal cell wall, leading to pore formation with K^+ leakage and cell death. The drug also interacts with cholesterol in mammalian cell membrane, which probably is the basis for its acute and chronic toxicity (Thornton SJ and Wasan KM, 2009) . AmB is also used in visceral

leishmaniasis (Saha , 2007) and in tissue culture to avoid fungal contamination (Luise, 2008).

Here we show that GRX cells, a model of mouse activated HSC, treated with AmB for 5 days reduce TGF- β 1 production, revert to a fat-storing phenotype and decrease their proliferating activity.

Material and Methods

Cell Culture and Treatment

GRX cell line (clone 123) was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Bio-Rio, Rio de Janeiro, Brazil). GRX culture was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, USA) supplemented with 5% fetal calf serum (Cultilab, Brazil) at 37°C in the presence of 5% CO₂. For the AmB treatment cells were plated onto a 6 well plate and after 24 hours the medium was changed for medium plus 1.25ug/ml AB (AmB, Invitrogen, USA) and kept in culture for 5 days. As a positive control, cells were treated with Indomethacin 0.13mM (Sigma, USA) for 7 days(Borojevic,1990).

Citotoxicity

Cell viability was assessed by the tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 phenyltetrazolium bromide test (MTT; Sigma Chemical, USA) using 10⁴ cells per well in 96-well plates. GRX cells were exposed to 1.25ug/ml and 2.50ug/ml AmB for 24 hours (n=4 independent tests /group) and MTT was performed as described by Balestrin et al. (2008). Briefly, the culture medium was removed and MTT (0.5 mg/mL in DMEM) was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. After lysing cells with 100 µL DMSO, viability was assessed by measuring absorbance at 570 nm using a microplate reader (BioRad, USA). The color intensity observed in each well was correlated to the number of viable cells, considering absorbance in non treated cells as 100% viability. HepG2 viability was assessed by the same method, using 10⁴ cells per well in 96-well plates. HepG2 cells were exposed to 1.25ug/ml and 2.50ug/ml AmB for 24 hours.

Intracellular Lipid Droplets

Intracellular lipid droplets were identified by Oil Red O (ORO) staining. GRX were stained with 0.5% ORO dissolved in 100% propylene glycol (Ineos, USA). The media was removed; the wells were gently rinsed and fixed with formalin. After washing, 1 ml of 100% PEG was added to each well for 2 min and then removed with a Pasteur pipette. ORO /PEG (1ml/well) were added for 10 min. The wells were rinsed in 60% PEG for 1 min, and washed with distilled water. Cells were counter-stained with hematoxin and observed under light microscope immediately (Kinkel et al 2005).

Secreted TGF- β 1

A sandwich ELISA for TGF- β 1 (Duo Set ELISA R&D, USA) was performed to quantify the cytokine in the cellular supernatant in 24 hour medium. Previously, the ELISA plate wells were coated with a capture antibody. The samples were activated with HCL 1N and neutralized with NAOH 1.2N 0.5M HEPES, then added to the plate and incubated for 2 hours. After a second incubation with the biotinylated detection antibody the reaction was revealed with streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase and color was read in a microplate reader at 450 nm (Zenyth 200rt, Anthos, UK). Results were calculated on a standard curve concentration and multiplied for the dilution factor. Each sample was normalized to the relative amount of total protein measured by the Lowry method.

RNA Expression

Cells were trypsinized and the total RNA was purified with RNA Easy (Qiagen, USA). RNA (3ug) was reversed transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Real-time PCR analysis was performed in triplicate on ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, USA) using Sybrgreen (Invitrogen, USA). The expression of TGF- β 1 was

normalized to that of GAPDH. Primer sequence and amplification conditions are described on supplementary table 1.

Wound Healing Assay

After 5 days of treatment with 1.25ug/ml AmB (or 7 days for Indomethacin) GRX cells were plated at 4×10^4 cells/well in a six wells plate and left for 24 hours in standard culture conditions. Wound-healing was then performed as described elsewhere (Ommenetti et al 2008). Briefly, a wound was manually created by scraping the cell monolayer with P200 pipette tip. Plates were observed daily for 48h or until the wound was closed.

Results

Citotoxicity

GRX cells are a fast-growing cell line with a doubling time of 24 hours. AmB (1.25ug/ml and 2.50ug/ml) for 24 hours showed a significant toxicity for GRX cells (figure 1) in a dose-dependent manner, with viability levels decreasing to 67.2% and 30.8% ($p \leq 0.001$), compared to non-treated cells. Interestingly, although HepG2 viability decreased to around 80% compared to control, there was no difference in toxicity between the two concentrations of AmB. The lowest concentration of AmB was then chosen for subsequent experiments.

Intracellular Lipid Droplets

GRX cells present a fibroblast-like phenotype. After treatment with AmB 1.25ug/ml for 5 days, GRX cells show a rounded-phenotype and accumulate lipids in their cytoplasm, confirmed by ORO (figure 2). Cell phenotype is strikingly similar to that of indomethacin-treated cells, with perinuclear lipid droplets. Control cells had no sign of lipid accumulation.

Secreted TGF- β 1

GRX cells release TGF- β 1 for the supernatant in levels around 190 pg/mg protein. Treatment with 1.25ug/ml AmB significantly reduces the amount of this cytokine into the media to levels lower than those seen after Indomethacin (20 pg/mg protein and 80 pg/mg protein, respectively, $p \leq 0,001$).

RNA Expression

Real time RT-PCR was not able to detect expression of TGF β on treated cells under the experimental conditions used – conversion of total RNA and 40 cycles of reaction. TGF β CT for control samples was around 31-32, and GAPDH had CT values around 12-15 both on control and treated samples.

Wound Healing

As expected, control GRX cells are able to close the wound within 24 hours .The same happens with indomethacin-treated cells. AmB-treated cells, however, were not able to close the wound in 48 hours (figure 3).

Discussion

AmB is a widely used antifungal agent, both in vivo and in vitro. Its use in tissue culture to avoid contamination is a common practice in many protocols. Luise SB et al 2008. However,

in this study we show that Amb triggered phenotypic changes in GRX cells. Although AmB antifungal action is related to its ergosterol-binding activity, its actual mechanism of action may be more complex. A known side effect of Amb is related to an increase in the inflammatory activity that occurs in some patients. This, in turn, is due to the elevated levels of IL-1, IL-6 and TNF α mediated by NF κ B activation (Rogers et al., 1998; Matsuo et al., 2006). In tissue culture, Luise et al (2005), showed that AmB impaired the growth of primary human dental pulp cells. In our study, GRX cells treated with AmB at the usual doses showed a great mortality. When AmB concentration was lowered to half the usual dose, phenotypic changes towards a quiescent (or deactivated) state were observed. The reversion of these cells to a quiescent state can be achieved by Indomethacin treatment (Andrade CM et al 2007) used as a positive control in our experiments. Nevertheless, the results obtained by AmB treatment were more prominent than those seen with Indomethacin – faster lipid droplets accumulated, reduced TGF- β 1 levels and marked impair in the wound healing assay. In accordance with our findings, patients treated with a liposomal form of AmB for Visceral Leishmaniosis presented negligible levels of TGF- β 1 and complete elimination of IL-10 (Rama Iniguez, Dea-Ayuela et al. 2006; Saha, Mondal et al. 2007). This is consistent with a complete elimination of the parasite but also with a proinflammatory effect of the drug. TGF- β 1 is a major mediator of the fibrogenic process and stimulates the production and deposition of collagen by HSC (Gressner and Weskirchen, 2005), and several studies blocking TGF- β 1 resulted in reduction of hepatic fibrosis (Deneme, 2006; Matsuzaki 2000). Interestingly, patients treated with AmB to visceral Leishmaniosis showed no signs of fibrosis, a common complication of *Leishmania* infection due to Kupffer cell activation (Duarte et al 2009). This may suggest a protective effect of AmB on reducing TGF- β 1 levels and the activation of HSC, thus corroborating our results. The mechanism by which TGF- β 1 decline in Amb treated GRX cells in culture, as in patients infected with *Leishmania* and treated with AmB, is

not clear. Anyway, its potential as antifibrogenic drug should be explored as it was able to decrease the viability of HSC without severely affecting hepatocytes, as shown by MTT studies on GRX and HepG2. Decreasing TGF- β 1 in the fibrotic liver may be beneficial not only because of its role on HSC activation, but also because it impairs hepatocyte proliferation, induces epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes and triggers hepatocyte apoptosis (Kaimore et al 2007). The decrease of TGF- β 1, in addition to the possible reversion to a lypocyte phenotype and the impaired wound healing in GRX cells, suggest a potential anti-fibrogenic effect of AmB. However, in vivo studies shall be conducted to test this hypothesis.

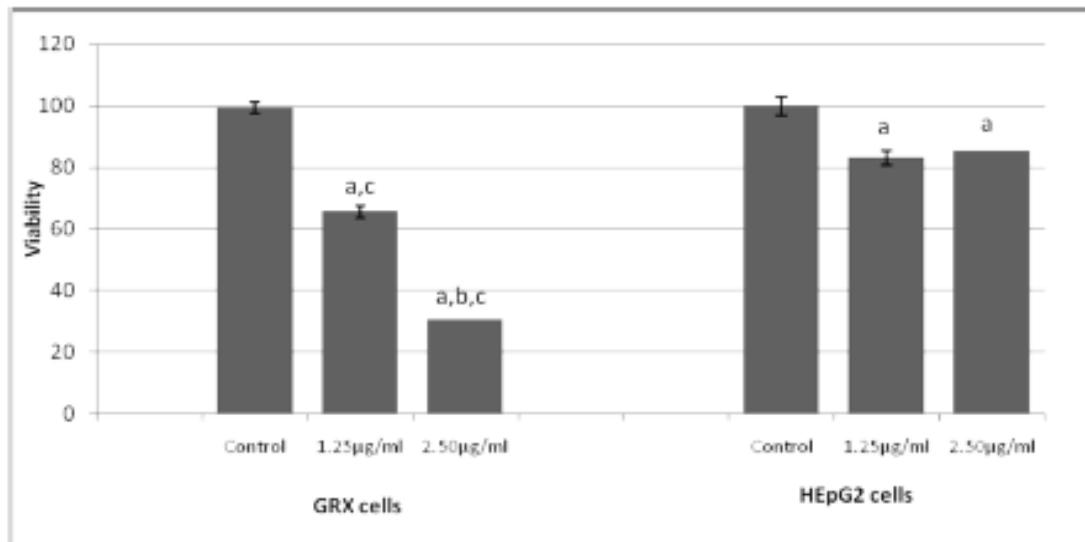


Fig 1.: MTT assay showing viability of GRX and HEpG2 cells after treatment with AmB (1.25ug/ml and 2.50ug/ml) for 24 hours. GRX cells died significantly more than HepG2 cells in relation to non-treated cells of each type (a, b and c = $p \leq 0,001$).

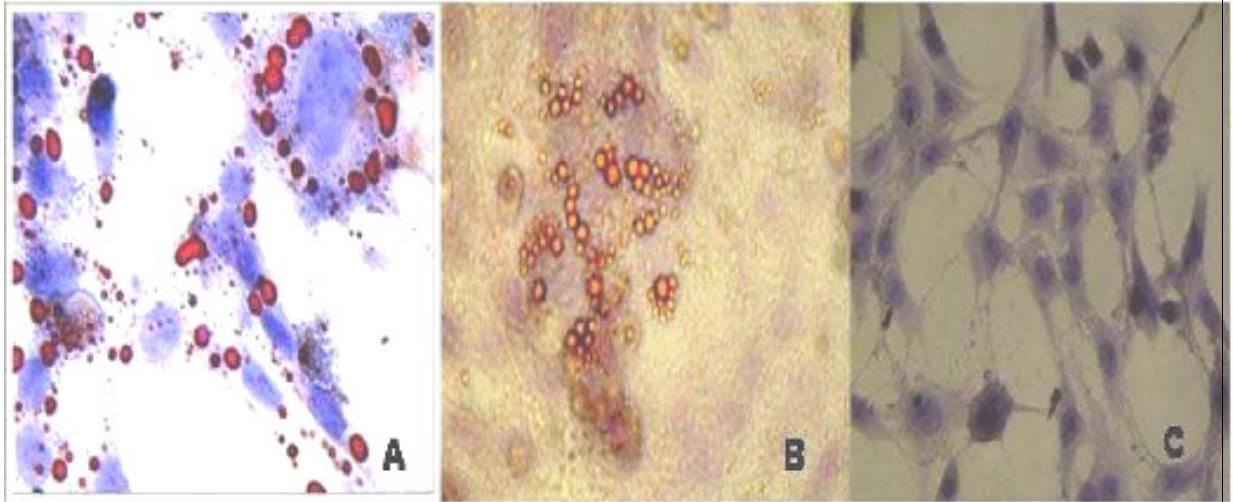


Fig 2: Oil red (ORO) staining for lipid droplets. (A) Control GRX cells; (B) Indomethacin-treated GRX cells and (C) Amphotericin B-treated GRX cells. Photomicrographs taken on inverted microscope (400X).

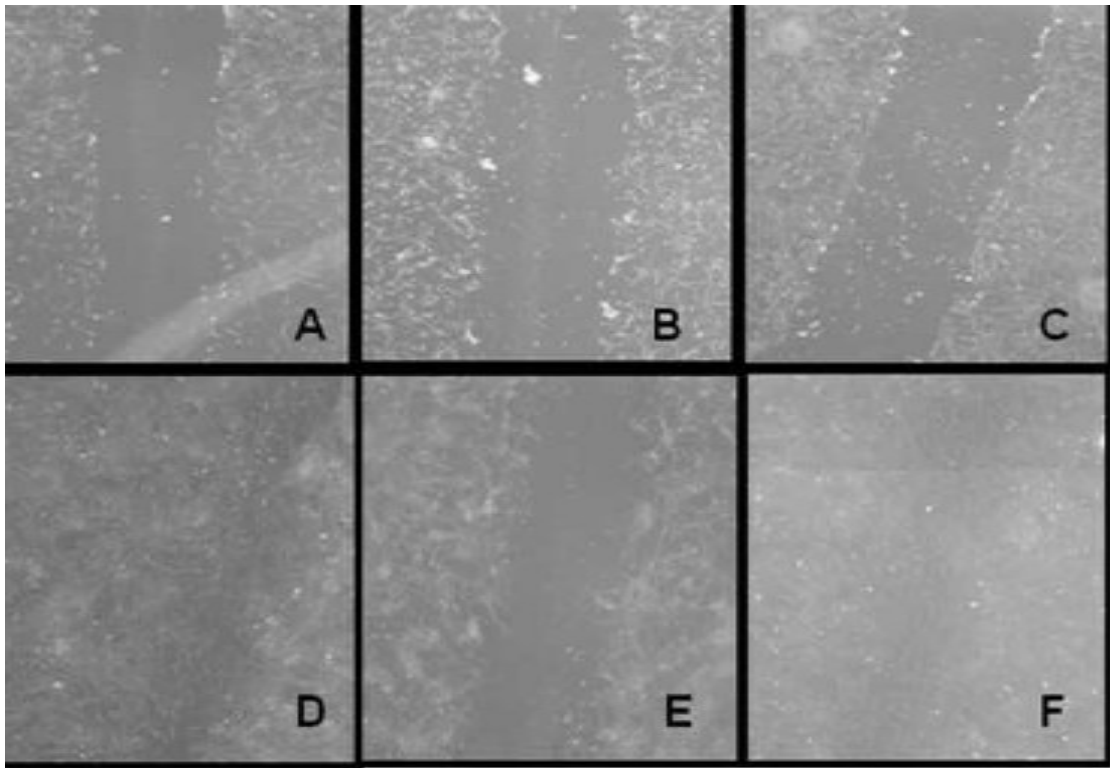


Fig. 3: Wound Healing Assay – Plate appearance at the wound (upper row) and after 48 hours (bottom row). Control GRX cells (A, D) and indomethacin-treated GRX cells (C,F) had already closed the wound, whereas AmB-treated GRX cells had not (B,E).

Acknowledgements

Funding for this project was provided by FIPE/HCPA. UM is recipient of a scholarship from CNPq (PQ-2).

References

Andrade CM, Roesch GC, Wink MR, Guimarães EL, Souza LF, Jardim FR, Guaragna RM, Bernard EA, Margis R, Borojevic R, Battastini AM, Guma FC. Activity and expression of ecto-5'-nucleotidase/CD73 are increased during phenotype conversion of a hepatic stellate cell line. *Life Sciences*. 2;82(1-2):21-9, 2008

Balestrin RC, Baldo G, Vieira MB, Sano R, Coelho JC, Giugliani R, Matte U Transient high-level expression of beta-galactosidase after transfection of fibroblasts from GM1 gangliosidosis patients with plasmid DNA. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. Apr;41(4):283-8, 2008

Borojevic R, Guaragna RM, Margis R, Dutra HS. In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In Vitro Cellular Development Biology*. Apr;26(4):361-8, 1990

Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: The nexus liver injury and fibrosis. *Hepatology*; **39**: 273–278. 2004

Deneme MA, Ok E, Akcan A, Akyildiz H, Soyuer I, Muhtarogl Single dose of anti-transforming growth factor-beta1 monoclonal antibody enhances liver regeneration after partial hepatectomy in biliary-obstructed rats. *Journal of Surgery Research*, 136(2):280-7, 200. 2008

Duarte MI, de Andrade HF Jr, Takamura CF, Sesso A, Tuon FF. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis . *Parasitology Research*. 104(5):1129-36, 2009.

Friedman, S. L. Hepatic fibrosis - overview. *Toxicology* 254(3), 120-9, 2008

Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *Journal of Cellular Molecular Medicine* 11(4):704-22, 2007

Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 27;282(30):22089-101 2007

Kinkel AD, Fernyhough ME, Helterline DL, Vierck JL, Oberg KS, Vance TJ, Hausman GJ, Hill RA, Dodson MV. Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*, 46(1):49-56, 2004

Luisi B S, Barbachan J.J, Chies J.A, Filho M. Use of amphotericin B as antifungal agent in culture medium for human dental pulp cells. *Revista Odonto Ciência* 23 (1), 58-62, 2008

Matsuzaki K. Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Frontiers in Bioscience* 1;14:2923-34, 2009

Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl

AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliaryfibrosis in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*.118(10):3331-42. 2008

Saha S, Mondal S, Ravindran R, Bhowmick S, Modak D, Mallick S, Rahman M, KarS, Goswami R, Guha SK, Pramanik N, Saha B, Ali N. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *Journal of Immunology*. 15;179(8):5592-603, 2007

Thornton SJ, Wasan KM. The reformulation of amphotericin B for oral administration to treat systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. *Expert Opinion in Drug Delivery*. Mar;6(3):271-84, 2009

Xu L, Hui AY, Albanis E, Arthur MJ, O'Byrne SM, Blaner WS, Mukherjee P, Friedman SL, Eng FJ. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54(1): 142-51, 2005

Artigo - 05

Short Communication a ser submetida ao Periódico - Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Transient transfection of shRNA using cationic lipids in a cell line of hepatic stellate cells

Fernanda dos Santos de Oliveira^{1,2,3}, Barbara Gross

mann¹, Carolina Uribe^{1,3}, Guilherme Baldo^{1,4}, Valeska Lagranha^{1,5}, Themis Reverbel da Silveira^{1,2,3}, Ursula Matte^{1,2,3*}

1- Gene Therapy Center, Research Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2- Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory, Research Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

3- Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

4- Post-Graduation Program on Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

5- Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author.

Abstract

GRX cell line display morphological characteristics of myofibroblasts and produce composite connective tissue/extracellular matrix that mimic the activated phenotype of hepatic stellate cells. Treatment with indomethacin or retinol induces the reversal of phenotype, evidenced by the accumulation of fat, reorganization of the cytoskeleton and induction of the quiescent state of treated cells. Here we show an attempt to revert these cells to a quiescent phenotype through the silencing of TGF- β 1, one of the main profibrogenic cytokines in the liver. GRX cells were transfected by lipofection with shRNA TGF- β 1 sequence, cloned onto pSuper, pSuper (empty plasmid) and pTracer (plasmid than containing GFP to evaluate transfection efficiency). TGF- β 1 expression was assessed by real-time PCR analysis performed using SYBRGreen and GAPDH as internal control. This expression was reduced in 20% with transient transfection of shRNA for TGF- β 1 and cells transfected with the empty plasmid showed an increase in the expression of TGF- β 1 of 10%. The low decrease in gene expression observed with shRNA for TGF- β 1 may be due to the low transfection efficiency since the number of GFP positive cells was under 10%. Efficient and safe mechanisms must be envisaged to guarantee that shRNA for TGF- β 1 can be delivered to hepatic stellate cells *in vivo*, where extracellular matrix deposition may also account as an additional barrier to transfection as in GRX cells.

Introduction

Hepatic stellate cells (HSC) are located at the space of Disse. Their main function in normal liver is retinol storing, but they are also involved in maintaining the homeostasis of the extracellular matrix (ECM) (1). During fibrogenesis differentiation of the quiescent HSC into activated myofibroblast (MFB) is triggered by paracrine signals. However, once activated, MFB can perpetrate their active state by autocrine signals, thus amplifying the response (2) . MFB play a leading role in hepatic fibrogenesis through proliferation, chemotaxis, and contractility, loss of retinoids, collagen production and expression of TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1). At this stage cells become more proliferative, moving through chemotaxis to the parenchyma, lose their retinoids stored, and produce large amounts of collagen, while there is an imbalance in the production of tissue metalloproteinases.(3)

The oldest HSC cell line, GRX, has been obtained by enzymatic digestion from livers of C3H/HeN mice infected with cercariae of *Schistosoma mansoni* BH strain by Borojevic et al. (1985)(4). GRX have the typical morphology of myofibroblasts; secrete collagen type I, II and IV, laminin and produce fibronectin, desmin and synthesize glycosaminoglycans, such as heparitine. Treatment with indomethacin or retinol induces the reversal of phenotype, evidenced by the accumulation of fat, reorganization of the cytoskeleton and induction of the quiescent state of treated cells (2).

Here we show an attempt to revert these cells to a quiescent phenotype through the silencing of TGF- β 1 (Transformant Growth Factor beta 1), one of the main cytokines involved in the activation of HSC (5). As GRX secrete ECM *in vitro*, transfection was performed in cells in suspension (Zhang M et al, 2007). We used a plasmid that expresses TGF- β 1 shRNA on pSuper (OligoEngine, Seattle, WA, USA), and a plasmid containing GFP (pTRACER, Invitrogen,USA) was used to evaluate transfection efficiency in GRX cells.

Methods

GRX cell line

GRX cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank and maintained in culture under standard conditions in humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) and 5% FBS (fetal bovine serum) (CultilabCampinas, SP, Brazil). To observe collagen deposition, GRX were fixed with 10% buffered formalin and stained with Sirius red.

Plasmid

The shRNA TGF-β1 sequence, cloned onto pSuper (OligoEngine, Seattle, WA, USA), (5'GATCCCCACTATCGACATGGAGCTGttcaagagaCAGCTCCATGTTCGATAGTCTTTTGG AAA 3') (Friese et al, 2004) was kindly provided by the group of Professor Michel Weller (Tübingen, Germany). As a control, pSuper without the specific shRNA TGF-β1 was used. In addition, pTRACER (Invitrogen, USA) was used as a marker gene to evaluate transfection efficiency. Plasmids were grown in *Escherichia coli* DH5-α, (Invitrogen, USA) and extracted with Maxiprep commercial kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions.

Transfection

One day before transfection, cells were seeded at a density of 5×10^5 cells per well on 24-well plates. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions, at 1:1 DNA-lipid ratio, both for pTRACER and pSuper. Transfections were performed separately for each plasmid. On the day of transfection, cells grown at 90% confluence were trypsinized and cell pellets collected by centrifugation at 3000 rpm for 2 min at room temperature in a benchtop microcentrifuge. Each cell pellet (from one well) was resuspended in 100 μl of the transfection complexes and the suspension was

incubated at room temperature for 15 min. At the end of incubation, 500 μ l of pre-warmed fresh cell growth medium (DMEM without FBS) was added and the suspension plated onto a new well of a 24-well plate. After 20 hours the medium was changed for fresh DMEM 5% FBS.

After 48 hours total RNA was extracted from pSuper transfected cells. Cells transfected with pTRACER were observed in an inverted microscope and photographed.

RNA Expression

Cells were trypsinized and total RNA was purified with RNA Easy (Qiagen, USA). RNA (3 μ g) was reversed transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Real-time PCR analysis was performed in triplicate on ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, USA) using SYBRGreen (Invitrogen, USA). The expression of TGF- β 1 was normalized to that of GAPDH. The difference in gene expression was calculated by the delta-delta Ct method. Primer sequence and amplification conditions are described on Supplementary table 1.

Results

As it would be expected, given their role on fibrogenesis, GRX cells secrete collagen in culture. Sirius red staining of normal GRX shows collagen deposition around the cells (figure 1).

In order to circumvent this matrix deposition that could reduce the efficiency of transfection, we trypsinized the cells and performed the transfection on cell suspensions. To estimate the efficiency of this method, we used a plasmid containing GFP as a marker gene. Under fluorescent microscopy, GFP positive cells could be visualized 48 hours after transfection. The number of positive cells however, was extremely low -under 10%.

Again, as expected, GRX cells express TGF- β 1, one of the main profibrogenic cytokines in the liver. This expression was only slightly reduced with transient transfection of shRNA for TGF- β 1. The mean Ct for non-transfected GRX was 23.5, whereas for transfected cells it increased for 27.0, thus representing a reduction of 20%. Interestingly, cells transfected with the empty plasmid showed an increase in the expression of TGF- β 1 of 10%.

Discussion

GRX cells display morphological characteristics of myofibroblasts and produce composite connective tissue/extracellular matrix that mimic the activated phenotype of HSC (4). It has been demonstrated that primary HSC have very low transfection efficiencies, as well as some cell lines (like LX-1) for which efficiencies of less than 1 % have been reported (2),

As shown here, the extensive collagen deposition that occurs in the culture of GRX could make it hard to transfect adherent cells. Therefore we used the method suggested by Zhang et al. (2007), transfecting the cells in suspension (6) . Even though, the increase in efficiency was not sufficient, as seen by only a minor fraction of GFP-positive cells 48 hours after transfection. This could be due to an increase in cell mortality, as many cells failed to adhere after transfection (data not shown).

In this sense, the low decrease in gene expression observed with shRNA TGF- β 1 may be due to the low transfection efficiency caused by the increased cell mortality. Some groups have reported that the efficiency of transfection in GRX is ~30% using Lipofectamine (2), which suggests that the transfection method used is viable.

Cheng et al. transfected immortalized rat hepatic stellate cells, HSC-T6, with shRNA targeting different regions of TGF- β 1 using pyridinium lipid (C16:1, amide linker, transisomer)/ L- α -dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) (1:1 mol/mol) cationic liposomes (7) as described by Zhu et al., 2008. (8) A decrease in TGF- β 1 was observed and also a marked reduction on other fibrogenic genes, like TIMP-1), α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen. In our case, downstream genes were not evaluated, due to the low transfection efficiency observed. It remains to be determined if the differences found with the

abovementioned protocol are related to the cell type analyzed (HSC-T6 *versus* GRX) or with the transfection protocol (pyridinium/DOPE *versus* Lipofectamine).

But it is noteworthy that inhibition of TGF- β 1 has the potential to be a powerful tool in treating fibrosis. Efficient and safe mechanisms must be envisaged to guarantee that shRNA for TGF- β 1 can be delivered to HSC *in vivo*, where ECM deposition may also account as an additional barrier to transfection.

Supplementary table 1 - Primer sequence and amplification conditions for TGF- β 1 and GAPDH analysis by Real-Time PCR using SYBRGreen.

Gene	Primers	Annealing	Amplicon
TGF- β 1	For: 5'GGACCTGGGTTGGAAGTGGAT 3' Rev: 5'TGTGTCCAGGCTCCAAATATAGG3'	49°C	95pb
GAPDH	For: 5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3' Rev: 5' GAGATGATGACCCTTTTGGC 3'	53°C	98pb

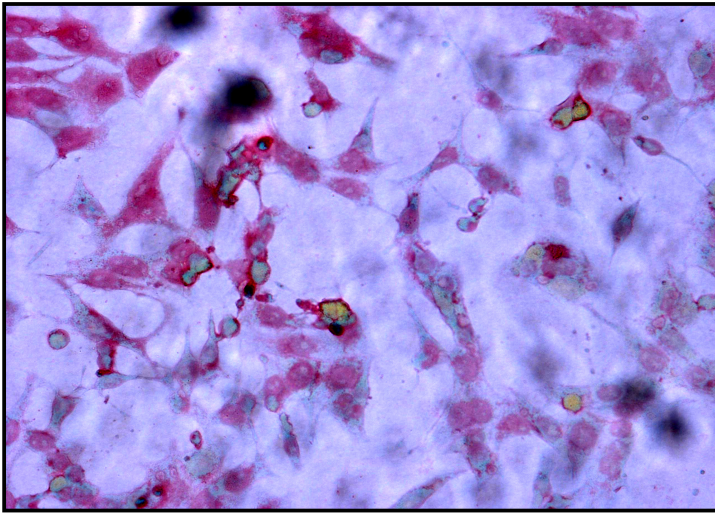


Figure 1: Photomicrography of GRX cells stained with Sirius red, showing collagen deposition. 200X

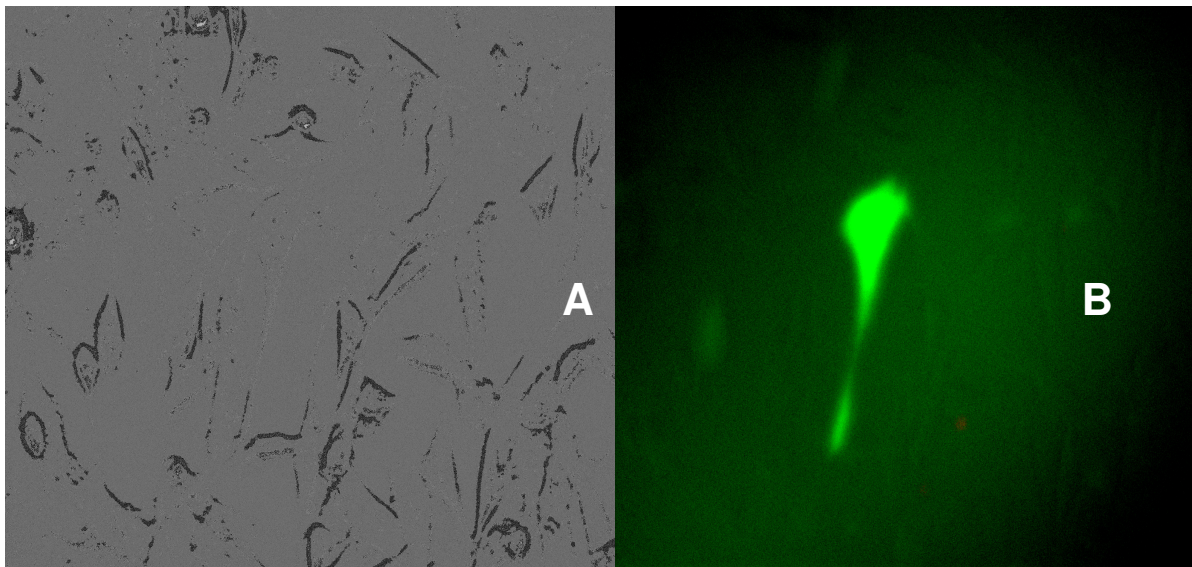


Figure 2: GRX cells transfected with pTRACER visualized under light (A) and fluorescent (B) microscopy. Note that the GFP positive cells (arrows) correspond to only a minor fraction of the cells present in the field.

References

1. Parola M, Marra F, Pinzani M 2008 Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 29:58-66.
2. Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R 2007 Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 11:704-722.
3. Hui AY, Friedman SL 2003 Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 5:1-23.
4. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourao PA, Emonard H, Grimaldi G, Jr., Grimaud JA 1985 Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol* 21:382-390.
5. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA 2007 Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1:S79-84.
6. Zhang M, Guller S, Huang Y 2007 Method to enhance transfection efficiency of cell lines and placental fibroblasts. *Placenta* 28:779-782.

7. **Cheng K, Yang N, Mahato RI 2009 TGF-beta1 Gene Silencing for Treating Liver Fibrosis. Mol Pharm 6:772-779.**

8. **Zhu L, Lu Y, Miller DD, Mahato RI 2008 Structural and formulation factors influencing pyridinium lipid-based gene transfer. Bioconjug Chem 19:2499-2512.**

5. DISCUSSÃO

A fibrose hepática associada ou não ao desenvolvimento de cirrose é uma situação clínica relacionada a importantes morbidade e mortalidade, atingindo todas as raças e faixas etárias. Representa uma resposta cicatricial do parênquima hepático a uma variedade de estímulos crônicos tais como as hepatites virais B e C, a Doença Hepática não Gordurosa, a exposição ao etanol ou a atresia biliar em crianças. Caracteriza-se pela excessiva deposição de matriz extracelular, a qual desorganiza a estrutura normal do parênquima hepático, o que resulta em importantes alterações nas fisiologias do fígado propriamente dito e de praticamente todos os sistemas. Não tratada, a fibrose evolui para cirrose, falência do órgão e morte (Parsons et al. 2007).

A biópsia hepática é considerada o padrão-auréu tanto para o diagnóstico de cirrose quanto para o estadiamento das atividades necroinflamatórias e fibrogenicas do parênquima hepático (Munteanu 2007). Entretanto, é um método relativamente caro e relacionado a raras, mas importantes complicações, especialmente nos pacientes pediátricos, que necessitam de sedação anestésica. Em amostras apropriadas de tecido hepático, estima-se que somente 1/50.000 do órgão total seja avaliado por este método, o que ainda o torna sujeito a erros amostrais (Burroughs and Cholongitas 2007).

Nos últimos anos, um número não desprezível de marcadores não invasivos de fibrose, tem sido desenvolvido, sendo objeto de várias publicações principalmente relacionadas à doença hepática crônica determinada pela infecção com o vírus da hepatite C (VHC). A grande variabilidade dos resultados e a não validação destes em populações não infectadas pelo VHC, tem limitado a sua utilidade. O maior progresso nesta área parece estar relacionado à avaliação do conteúdo de colágeno no tecido hepático (Leroy et al. 2007).

O fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) é uma importante citocina envolvida na produção e no acúmulo de matriz extracelular. Após o dano hepático, muitas células são responsáveis pela produção desta citocina no parênquima: miofibroblastos, hepatócitos bem como células do sistema imune (Wynn 2008).

O presente estudo teve três principais objetivos: avaliar, *in vivo*, o comportamento do TGF- β 1 no desenvolvimento da fibrose hepática, verificar, *in vitro*, o efeito da sua diminuição em células estreladas hepáticas ativadas e avaliar o efeito do tratamento de células estreladas hepáticas com Anfotericina B sobre os níveis de TGF- β 1 e sua reversão ao fenótipo quiescente.

Para estudar a cinética da citocina no soro e a sua correlação com o aumento da deposição de colágeno durante o desenvolvimento da fibrogênese, avaliamos animais submetidos ao modelo de fibrose por Tetracloreto de Carbono (CCl₄). Neste modelo os animais iniciam o processo de fibrose em torno da quarta semana e a cirrose é observada a partir da 12a semana de tratamento (Goldani et al. 2007). O modelo experimental de fibrogênese por CCl₄ mimetiza a fibrose alcoólica em humanos e é um excelente modelo para o estudo do dano hepático por toxicidade crônica (Okazaki et al. 2000).

Nossos achados demonstram que o TGF- β 1 sérico apresenta uma correlação inversa com os níveis de colágeno no tecido hepático. Assim, a partir da sexta semana se observa um aumento na concentração sérica da citocina quando os níveis de colágeno teciduais ainda estão baixos, porém na décima segunda semana os valores de TGF- β 1 séricos estão baixos enquanto a densidade de colágeno no tecido aumenta. Esta diferença pode ser devida a diferentes fatores, tais como a diminuição da expressão de TGF- β 1 no tecido e/ou a diminuição da sua liberação para a circulação (Rosensweig et al. 1998). Nakatsukasa et al. (1990) estudaram a expressão tecidual de TGF- β 1 no fígado de animais tratados por CCl₄

durante 12 semanas e observaram flutuações nos níveis de expressão ao longo do tempo mas sem uma tendência definida (Nakatsukasa et al. 1990). No modelo estudado por nós, na 16ª semana os animais apresentam cirrose, com formação de nódulos regenerativos e aumento da densidade de colágeno, sugerindo que a diminuição da concentração sérica seja por redução da permeabilidade tecidual neste modelo. Entretanto, cabe ressaltar que não foi avaliada a expressão tecidual do TGF- β 1. De qualquer forma essa observação é importante, pois indica que a concentração sérica dessa citocina deve ser utilizada com cautela como um marcador não invasivo do processo de fibrogênese no modelo animal de cirrose por CCl₄.

Contudo, é razoável supor que o desenvolvimento da doença hepática em humanos tenha uma dinâmica diferente do que nos modelos animais. Nos modelos animais, a velocidade de progressão da fibrose é muito maior do que na doença humana. Nesse sentido seria interessante comparar o que ocorre em uma doença hepática de progressão relativamente rápida, como a atresia biliar.

A atresia biliar a principal indicação de transplante hepático na faixa etária pediátrica. Quanto à causa, o citomegalovírus, o reovírus e o rotavírus têm sido os agentes mais estudados como possíveis desencadeadores da obstrução imunomediada da árvore biliar. A resposta imune, especialmente o predomínio da resposta Th1 e do interferon gama, e as alterações do desenvolvimento embrionário da árvore biliar são aspectos que podem participar na etiopatogênese da obliteração das vias biliares extra-hepáticas que desencadeia a atresia biliar (de Carvalho et al. 2007).

Sendo assim, investigamos como o TGF- β 1 se comporta em pacientes com atresia biliar em dois momentos: ao diagnóstico e no momento do transplante hepático. Esses momentos foram escolhidos pela existência de fragmento de tecido hepático disponível

(biópsia ou explante) e por representarem dois estágios diferentes da fibrose hepática, um mais precoce e outro tardio.

As crianças analisadas no momento que denominamos de diagnóstico fizeram, além da biópsia hepática, a cirurgia de portenterostomia, com exceção de uma. Poucos trabalhos na literatura trazem dados relativos ao TGF- β 1 em crianças, contudo Rosensweig, et al. (1998) (Rosensweig et al. 1998) encontraram uma relação inversa de valores de TGF- β 1 com a idade em crianças saudáveis, porém a diminuição dos níveis TGF- β 1 é mais acentuada após os cinco anos de idade. Baseando-se neste achado, é importante assinalar que não houve diferença significativa da idade dos pacientes no momento do transplante hepático e controles em nosso estudo. No entanto, os pacientes no momento do diagnóstico foram significativamente mais jovens do que os outros dois grupos, ainda que, em teoria, todos os três grupos sejam comparáveis (Rosensweig et al. 1998). Nenhuma diferença foi encontrada nos valores de TGF- β 1 no momento do diagnóstico quando comparado ao grupo controle ou aos pacientes no momento do transplante, provavelmente devido à grande variação observada naquele grupo. Essa variação pode refletir o fato de que o diagnóstico é realizado em pacientes em diferentes estágios de doença hepática, uma vez que há mais de uma etiologia para a atresia biliar e algumas crianças podem iniciar o processo *in utero*, enquanto outros irão desenvolver a doença ao nascimento (de Carvalho et al. 2007). Apesar de que nenhum paciente em nossa amostra apresentava malformações extra-hepáticas associadas, que são normalmente relacionadas com a forma intra-uterina de atresia biliar, não é possível determinar por quanto tempo a doença esteve ativa nesses pacientes até o diagnóstico. A análise das biópsias hepáticas poderia fornecer uma indicação sobre a duração da doença, apesar da variabilidade individual em resposta a lesões hepáticas (Powell et al. 2000) Porém não houve nenhuma correlação clara entre TGF- β 1 e densidade de colágeno.

Assim como no modelo animal de CCl₄, uma queda acentuada nos níveis séricos TGF- β 1 foi observada nos pacientes no momento do transplante, em que os valores encontrados foram menores que nos controles. A fim de avaliar as razões para essa redução, analisamos expressão de TGF- β 1 por imunistoquímica nas biópsias hepáticas e nos explantes de fígado. Nestes últimos, praticamente não houve expressão de TGF- β 1, enquanto nas biópsias a expressão foi variável, mas as células positivas eram hepatócitos.

A ausência de expressão de TGF- β 1 nos explantes de fígado foi relatada também por Ahmed et al. (2000) que estudou pacientes com fibrose por atresia biliar na fase precoce e tardia (Faiz Kabir Uddin Ahmed et al. 2000). Contraditoriamente, Lee et al. (2008), encontrou um aumento nos níveis de mRNA de TGF- β 1 nos explantes de fígado, em comparação com biópsias obtidas na cirurgia de Kasai (Lee et al. 2004). Por outro lado, Ahmed et al. (2000) descreveu células predominantemente positivas que podiam ser caracterizadas como miofibroblastos e não como hepatócitos. Nossos achados, porém estão de acordo com a observação de Kalmoru et al. (2007), que recentemente demonstraram que hepatócitos tratados com TGF- β 1 em cultura expressam colágeno (Kaimori et al. 2007). Neste mesmo sentido, Piekarska et al. (2006) estudou a expressão de TGF- β 1 e Ki-67 no parênquima de indivíduos com doença hepática pelas mais diversas etiologias, tanto em hepatócitos quanto em HSC (Piekarska et al. 2006). Além do score de fibrose também foi observado o grau de inflamação do parênquima. Em hepatócitos, a expressão máxima de TGF- β 1 foi observada quando a inflamação e a fibrose eram moderadas. No grau 2 de inflamação foi observado o maior grau de proliferação destas células. Parece que o decréscimo de Ki-67 é uma resposta a alta atividade anti-proliferativa de TGF- β 1 nos hepatócitos.

A presença de hepatócitos produzindo colágeno no parênquima suporta a idéia de que mais de uma célula é a responsável pela produção de citocinas pró-fibrogênicas no parênquima, e talvez as células estreladas não sejam o único alvo para terapia. Kalmori et al.

(2007) sugerem que hepatócitos que escapam da apoptose induzida por TGF- β 1 iniciam a produção de colágeno, expressando um fenótipo tipo-miofibroblasto, demonstrando que TGF- β 1 pode sim induzir Transição Epitélio Mesenquimatoso (EMT). Ensaios preliminares realizados por nosso grupo e não incluídos neste trabalho corroboram a marcação positiva para Ki67 e também a expressão de CK7 em hepatócitos.

Um achado importante do estudo com pacientes com atresia biliar é que não houve uma correlação direta entre os níveis TGF- β 1 sérico e a contagem de plaquetas, indicando que a principal fonte de TGF- β 1 nesses pacientes não é derivado de plaquetas. Isso é importante pois segundo Grainger et al (1995) 40% do TGF- β 1 circulante é derivado das plaquetas (Grainger et al. 1995). Isso também indica que a diminuição de TGF- β 1 no estágio final da doença hepática não é secundária à trombocitopenia.

Além disso, usamos o APRI (*AST/Platelet Ratio Index*) como um marcador clinicamente relevante para o estágio da doença hepática. Todos os indivíduos no momento do transplante tinham APRI superior 2 e no momento do diagnóstico, inferior a 2. Isso está de acordo com Wai et al. (2003) que estabelece o ponto de corte de 1,5 para fibrose significativa e 2 para cirrose (Wai et al. 2003). Nos quatro pacientes com níveis mais baixos de TGF- β 1 no momento do diagnóstico APRI teve média de 1,1 (\pm 0,4), enquanto que naqueles com níveis mais elevados de TGF- β 1 APRI teve média de 1,6 (\pm 0,2). Essas observações devem ser confirmadas em um número maior de pacientes para que se possa sugerir a validade do APRI como marcador não invasivo de fibrose na atresia biliar.

Apesar de que o uso de TGF- β 1 como biomarcador de fibrose e cirrose seja freqüentemente sugerido, os resultados usando esta citocina são controversos (Rosensweig, Omori et al. 1998; Lebensztejn, Sobaniec-Lotowska et al. 2004). De qualquer forma, sua

importância como fator determinante para o início da fibrose está bem esclarecido (Weiler-Normann et al. 2007). Isto torna o TGF- β 1 um alvo ideal para terapias anti-fibróticas.

Além dos diferentes modelos animais descritos atualmente na literatura, a possibilidade de estudar células estreladas isoladas em cultura tem sido amplamente utilizada para testar as mais diferentes moléculas. A possibilidade de extração de HSC ativadas de animais com fibrose possibilitou muitos estudos, contudo esta técnica é cara e as células não sobrevivem por muito tempo em cultura, limitando seu uso. Linhagens de células estreladas são modelos úteis para a classificação de agentes terapêuticos emergentes para fibrose hepática (Herrmann et al. 2007).

Na prática, vários modelos terapêuticos específicos para pacientes com diferentes doenças hepáticas tem sido desenvolvidos com relativo sucesso, o que inclui o tratamento para as infecções virais B e C. A terapia anti-fibrogênica embora tenha alcançado grande avanço nas últimas duas décadas, ainda merece ser melhor elucidada (Rockey 2008).

A Anfotericina B (AmB) é amplamente utilizada como um agente antifúngico, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Seu uso em cultura de tecidos, para evitar contaminação, é uma prática comum em muitos protocolos. Em nosso laboratório, utilizamos a AmB nas células GRX como parte do protocolo usual de cultura. Entretanto, percebemos mudanças fenotípicas nessas células, assim como um aumento da mortalidade. Decidimos então avaliar o seu potencial para desativação do fenótipo ativado das células GRX e seu efeito sobre a produção de TGF- β 1.

Em nosso estudo, células GRX tratadas com doses habituais de AmB apresentaram um aumento de mortalidade avaliado por MTT. Quando a concentração de AmB foi reduzida para a metade, mudanças fenotípicas para um estado quiescente (ou desativado) foram observadas. Os resultados obtidos com AmB foram mais proeminentes do que os observados com

Indometacina, uma substância sabidamente capaz de reverter o fenótipo ativado dessas células (Andrade et al. 2003). Observou-se uma redução maior dos níveis de TGF- β 1, um acúmulo mais rápido de gotículas lipídicas e menor atividade proliferativa medida por ensaio de cicatrização (*wound healing*).

AmB é utilizada para o tratamento de leishmaniose visceral. Um dos seus efeitos colaterais conhecidos está relacionado ao aumento da atividade inflamatória que ocorre em alguns pacientes. Isto, por sua vez, é mediado pela ativação do NF κ B devido à elevação dos níveis de IL-1, IL-6 e TNF α (Rogers et al. 2002); (Matsuo et al. 2006). Pacientes tratados com uma forma de lipossomal AmB apresentaram uma redução importante dos níveis de TGF- β 1 e de IL-10 (Rama Iniguez et al. 2006); (Saha et al. 2007). Curiosamente, pacientes tratados com AmB não mostraram sinais de fibrose hepática, uma complicação comum da Leishmaniose visceral (Duarte et al. 2009). Isto pode sugerir uma efeito protetor da AmB pela redução dos níveis de TGF- β 1 e menor ativação das HSC, corroborando assim nossos resultados.

O mecanismo pelo qual ocorre o declínio de TGF- β 1 nas células GRX tratadas com Amb e nos pacientes infectados com *Leishmania* não está claro. De qualquer forma, um dos nossos achados mais interessantes neste trabalho foi o de que hepatócitos imortalizados não reagem da mesma forma na presença de AmB. Nossos experimentos de viabilidade celular através de MTT mostraram que poucos hepatócitos morriam na presença de AmB. Tendo em vista que a apoptose de hepatócitos é um dos fatores que contribui para a fibrogênese hepática, essa droga pode ser interessante para tratamento da fibrose. Contudo, estudos *in vivo* devem ser conduzidos para testar essa hipótese.

Um dos maiores desafios quando se quer atingir uma população única de células em um determinado órgão é a especificidade que a droga deve possuir. Por exemplo, conforme

descrito acima, uma droga que cause a apoptose de HSC pode ser desejável desde que não tenha o mesmo efeito sobre os hepatócitos.

Neste sentido, a terapia gênica pode ser uma ferramenta interessante ao combinar mecanismos de direcionamento do vetor e da expressão gênica de modo a obter uma especificidade celular. Alguns estudos foram realizados neste sentido, como por exemplo, o trabalho de Janoschek et al. (2004) que utilizou um promotor de TIMP-1 para direcionar a expressão do gene da timidina kinase às HSC, em uma estratégia conhecida como “gene suicida”(Janoschek et al. 2004).

A ferramenta de RNA de interferência tem sido bastante utilizada em diversos experimentos para tratar fibrose hepática, uma vez que essa é causada pela liberação exacerbada de inúmeras citocinas e proteínas. Neste estudo utilizamos o silenciamento gênico para verificar se a redução da expressão de TGF- β 1 em uma linhagem de célula estrelada ativada poderia ser realizada com um vetor não viral contendo um shRNA para TGF- β 1.

Conseguimos obter uma redução de 20% na expressão de TGF β 1 medido pelos níveis de mRNA 48 horas após a transfecção. Esse baixo valor de inibição pode ser devido à baixa eficiência de transfecção. Usando um vetor contendo o gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*) para avaliar a eficiência do método de transfecção, obtivemos menos de 10% das células positivas quando observadas em microscopia de fluorescência.

Culturas primárias de células estreladas são difíceis de serem transfectadas contudo eficiências de transfecção de aproximadamente 30% já foram descritas para linhagens de células estreladas usando Lipofectamina (Herrmann et al. 2007). Parte da dificuldade deve-se à síntese de matriz extracelular que ocorre em cultura, com deposição de colágeno ao redor das células GRX. Por este motivo optamos pela técnica de transfecção em suspensão,

conforme descrita por (Zhang et al. 2007). Entretanto é possível que parte da baixa eficiência obtida deva-se justamente à morte de células no processo de transfecção.

Cheng et al, (2009) transfectaram HSC imortalizadas de ratos (HSC-T6) com shRNA para diferentes regiões do TGF- β 1 usando um composto lipídico piridinium/DOPE, (Cheng et al. 2009) conforme descrito por (Zhu et al. 2008) . Foi observada uma diminuição no TGF- β 1 e em outros genes fibrogênicos como TIMP-1), α -SMA e colágeno tipo I. Não é possível determinar se a diferença nos resultados obtidos por este grupo devem-se ao diferente tipo celular utilizado (HSC-T6 *versus* GRX) ou ao protocolo de transfecção (piridinium/DOPE *versus* Lipofectamina). Entretanto é certo que a inibição de TGF- β 1 é um alvo importante para o tratamento da fibrose.

Como já demonstrado na literatura sugere-se que a produção de TGF- β 1, um marcador indireto de ativação da célula estrelada, seja um evento precoce que se segue a um determinado estímulo fibrogênico (Parsons et al. 2007). Nos estágios de fibrose mais avançada, parece haver uma estabilização na produção desta citocina, o que dificulta a sua utilização como marcador não invasivo de fibrose. Isto provavelmente deve-se ao fato de que enquanto o acúmulo de colágeno no tecido é um processo gradual e cumulativo, a dinâmica da produção das citocinas que regulam este processo é bem mais complexa.

De qualquer forma, o TGF- β 1 é uma importante citocina envolvida na ativação precoce da célula estrelada. Assim, novas opções terapêuticas dirigidas a bloquear os passos iniciais da fibrogênese podem ter o TGF- β 1 como alvo. Neste estudo, o uso da Anfotericina B se mostrou eficaz em reduzir a produção de TGF- β 1, o que foi concordante com a modificação do fenótipo da célula estrelada.

Ainda que a estratégia de inibição do RNA seja promissora, muitos ajustes se fazem necessários antes que possa ser utilizada em ensaios clínicos.

6. CONCLUSÕES

A) O comportamento do TGF- β 1 no desenvolvimento da fibrose hepática foi avaliado *in vivo* em um modelo animal de cirrose por Tetracloreto de Carbono e em pacientes com Atresia Biliar; também foi verificado *in vitro* o efeito da sua diminuição em células estreladas hepáticas ativadas com o uso de Anfotericina B e foi feita uma tentativa de transfeção com RNA de interferência.

B) No modelo murino de cirrose por Tetracloreto de Carbono foi verificada uma correlação negativa entre os níveis séricos de TGF- β 1 e a densidade de colágeno no tecido hepático.

C.) Nos pacientes com Atresia Biliar os níveis séricos e a expressão tecidual de TGF- β 1 no momento do diagnóstico e ao transplante, não se correlacionaram com a densidade de colágeno no tecido hepático. No momento do diagnóstico houve uma correlação negativa entre os níveis séricos de TGF- β 1 e a contagem de plaquetas. A expressão sérica e tecidual de TGF- β 1 estava diminuída ao transplante.

D) O uso de Anfotericina B reduziu a taxa de proliferação das células GRX, bem como os níveis de TGF- β 1 e levou à sua reversão ao fenótipo quiescente.

E) A baixa eficiência de transfeção do sistema utilizado não permitiu avaliar o efeito do silenciamento da expressão de TGF- β 1 com o uso de RNA de interferência em células estreladas hepáticas *in vitro*.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Andrade CM, Trindade VM, Cardoso CC, Ziulkoski AL, Trugo LC, Guaragna RM, Borojevic R, Guma FC.. Changes of sphingolipid species in the phenotype conversion from myofibroblasts to lipocytes in hepatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2003, 88: 533-544.
2. Anselmi K, Stolz DB, Nalesnik M, Watkins SC, Kamath R, Gandhi CR. Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: exacerbation by caspase and serine protease inhibition. *J Hepatol* 2007, 47: 103-113.
3. Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R.. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 2003,3: 29.
4. Bezerra JA. The next challenge in pediatric cholestasis: deciphering the pathogenesis of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, 43 Suppl 1: S23-29.
5. Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, Domont GB, Mourao PA, Emonard H, Grimaldi G, Jr., Grimaud JA.. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985, 21: 382-390.
6. Burroughs AK, Cholongitas E. Non-invasive tests for liver fibrosis: encouraging or discouraging results? *J Hepatol* 2007,46: 751-755.
7. Castera L. 2008. Assessing liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2: 541-552.
8. Castera L, Le Bail B, Roudot-Thoraval F, Bernard PH, Foucher J, Merrouche W, Couzigou P, de Ledinghen V..Early detection in routine clinical practice of cirrhosis and oesophageal varices in chronic hepatitis C: comparison of transient elastography (FibroScan) with standard laboratory tests and non-invasive scores. *J Hepatol* 2009,50: 59-68.
9. Chen SW, Zhang XR, Wang CZ, Chen WZ, Xie WF, Chen YX. RNA interference targeting the platelet-derived growth factor receptor beta subunit ameliorates experimental hepatic fibrosis in rats. *Liver Int* 2008 28: 1446-1457.
10. Cheng K, Yang N, Mahato RI.. TGF-beta1 Gene Silencing for Treating Liver Fibrosis. *Mol Pharm* 2009 ,6: 772-779.
11. de Carvalho E, Ivantes CA, Bezerra JA.. Extrahepatic biliary atresia: current concepts and future directions. *J Pediatr* 2007 ,(Rio J) 83: 105-120.
12. de Ledinghen V, et al.. Liver stiffness measurement in children using FibroScan: feasibility study and comparison with Fibrotest, aspartate transaminase to platelets ratio index, and liver biopsy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007,45: 443-450.

13. de Oliveira CP, de Lima VM, Simplicio FI, Soriano FG, de Mello ES, de Souza HP, Alves VA, Laurindo FR, Carrilho FJ, de Oliveira MG.. Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *J Am Coll Nutr* 2008,27: 299-305.
14. Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C.. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett* 2008,582: 68-73.
15. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV.. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985,316: 701-705.
16. 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: 1094-1106.
17. Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM.. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001, 502: 4-10.
18. Duarte MI, de Andrade HF, Jr., Takamura CF, Sesso A, Tuon FF.. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009,104: 1129-1136.
19. Faiz Kabir Uddin Ahmed A, Ohtani H, Nio M, Funaki N, Iwami D, Kumagai S, Sato E, Nagura H, Ohi R. In situ expression of fibrogenic growth factors and their receptors in biliary atresia: comparison between early and late stages. *J Pathol* 2000,192: 73-80.
20. Flisiak R, Prokopowicz D, Jaroszewicz J, Flisiak I. Plasma transforming growth factor-beta(1) in acute viral hepatitis. *Med Sci Monit* 2005,11: CR304-308.
21. Fowell AJ, Iredale JP. Emerging therapies for liver fibrosis. *Dig Dis* 2006,.24: 174-183.
22. Friedman SL.. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000,275: 2247-2250.
23. —
24. Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology* 2008,254: 120-129.
25. Friedman SL, Bansal MB.. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* 2006, 43: S82-88.
26. Friedman SL, Maher JJ, Bissell DM. Mechanisms and therapy of hepatic fibrosis: report of the AASLD Single Topic Basic Research Conference. *Hepatology* 2000,32: 1403-1408.

27. Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM.. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2007,45: 242-249.
28. Gao B, Radaeva S, Jeong WI. Activation of natural killer cells inhibits liver fibrosis: a novel strategy to treat liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007,1: 173-180.
29. Gieling RG, Burt AD, Mann DA. Fibrosis and cirrhosis reversibility - molecular mechanisms. *Clin Liver Dis* 2008,12: 915-937, xi.
30. Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR. The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2007,58: 331-337.
31. Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2008,1782: 197-228.
32. Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC.. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med* 1995,1: 932-937.
33. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S.. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002,7: d793-807.
34. Guido M, Rugge M.. Metachronous viral hepatitis. *Liver* 2000,20: 188.
35. Guimaraes EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Bernard EA, Guma FC.. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int* 2007,27: 1255-1264.
36. Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R.. Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function? *J Cell Mol Med* 2007,11: 704-722.
37. Houglum K, Venkataramani A, Lyche K, Chojkier M.. A pilot study of the effects of d-alpha-tocopherol on hepatic stellate cell activation in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1997,113: 1069-1073.
38. Hu YB, Li DG, Lu HM.. Modified synthetic siRNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits hepatic fibrogenesis in rats. *J Gene Med* 2007,9: 217-229.
39. Imuro Y, Brenner DA. 2008. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res* 25: 249-258.
40. Ito T, Nemoto M.. Kupfer's cells and fat storing cells in the capillary wall of human liver.]. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1952,24: 243-258.
41. Janoschek N, van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R. Induction of cell death in activated hepatic stellate cells by targeted gene expression of the thymidine kinase/ganciclovir system.
42. *Biochem Biophys Res Commun* 2004,316: 1107-1115.

43. Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A.. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007,282: 22089-22101.
44. Kanzler S, Baumann M, Schirmacher P, Dries V, Bayer E, Gerken G, Dienes HP, Lohse AW..Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. *J Viral Hepat* 2001,8: 430-437.
45. Kisseleva T, Brenner DA.. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008,233: 109-122.
46. Lee SY, Chuang JH, Huang CC, Chou MH, Wu CL, Chen CM, Hsieh CS, Chen CL. Identification of transforming growth factors actively transcribed during the progress of liver fibrosis in biliary atresia.
47. *J Pediatr Surg* 2004,39: 702-708.
48. Leroy V, Hilleret MN, Sturm N, Trocme C, Renversez JC, Faure P, Morel F, Zarski JP. Prospective comparison of six non-invasive scores for the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2007,46: 775-782.

49. Mallory TB.The pathology of epidemic hepatitis. *Bull N Y Acad Med* 1948,24: 197 [Discussion 200].
50. Matsuo K, Hotokezaka H, Ohara N, Fujimura Y, Yoshimura A, Okada Y, Hara Y, Yoshida N, Nakayama K.. Analysis of amphotericin B-induced cell signaling with chemical inhibitors of signaling molecules. *Microbiol Immunol* 2006, 50: 337-347.
51. Matsuzaki K.. Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 2009, 14: 2923-2934.
52. Meijer DK, Molema G.. Targeting of drugs to the liver. *Semin Liver Dis* 1995, 15: 202-256.
53. Mermelstein CS, Guma FC, Mello TG, Fortuna VA, Guaragna RM, Costa ML, Borojevic R. Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells: reorganisation of the actin cytoskeleton. *Cell Tissue Res* 2001., 306: 75-83.
54. Mitchison HC, Palmer JM, Bassendine MF, Watson AJ, Record CO, James OF. A controlled trial of prednisolone treatment in primary biliary cirrhosis. Three-year results. *J Hepatol* 1992, 15: 336-344.
55. Munteanu M.. Non-invasive biomarkers FibroTest-ActiTest for replacing invasive liver biopsy: the need for change and action. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007, 16: 173-174.

56. 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: 171-180.
57. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, Cabrera R, Liu C, Davis GL. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003, 38: 859-868.
58. Neumann S, Kaup FJ, Beardi B. Plasma concentration of transforming growth factor-beta 1 and hepatic fibrosis in dogs. *Can J Vet Res* 2008. 72: 428-431.
59. Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2005, 128: 108-120.
60. Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Arai M, Maruyama K.. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol* 2000,15 Suppl: D26-32.
61. Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA.. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, 22 Suppl 1: S79-84.
62. Piekarska A, Piekarski J, Omulecka A, Szymczak W, Kubiak R.. Expression of Ki-67, transforming growth factor beta1, and B-cell lymphoma-leukemia-2 in liver tissue of patients with chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2006,21: 700-710.
63. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR.. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000,31: 828-833.
64. Poynard T, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003,,38: 257-265.
65. Rama Iniguez S, Dea-Ayuela MA, Sanchez-Brunete JA, Torrado JJ, Alunda JM, Bolas-Fernandez F.. Real-time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006,50: 1195-1201.
66. Ramadori G..The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. New insights into pathophysiology of an intriguing cell. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991,61: 147-158.
67. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001,21: 129-136.
68. Roberts AB, et al. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry* 1983.22: 5692-5698.

69. 1991. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp* 157: 7-15; discussion 15-28.
70. Rockey DC.. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. *Clin Liver Dis* 2008, 12: 939-962, xi.
71. Rogers PD, Pearson MM, Cleary JD, Sullivan DC, Chapman SW. Differential expression of genes encoding immunomodulatory proteins in response to amphotericin B in human mononuclear cells identified by cDNA microarray analysis. *J Antimicrob Chemother* 2002, 50: 811-817.
72. Rosensweig JN, Omori M, Page K, Potter CJ, Perlman EJ, Thorgeirsson SS, Schwarz KB.. Transforming growth factor-beta1 in plasma and liver of children with liver disease. *Pediatr Res* 1998,44: 402-409.
73. Saha S, et al. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J Immunol* 2007, 179: 5592-5603.
74. Sebastiani G, Alberti A.. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J Gastroenterol* 2006 ,12: 3682-3694.
75. Sokol RJ.. Biliary atresia screening: why, when, and how? *Pediatrics* 2009,123: e951-952.
76. Sun C, Li DG, Chen YW, Wang BC, Sun QL, Lu HM. Transplantation of urokinase-type plasminogen activator gene-modified bone marrow-derived liver stem cells reduces liver fibrosis in rats. *J Gene Med* 2008, 10: 855-866.
77. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ.. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003,37: 87-95.
78. Tilg H, et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J Hepatol* 2003, 38: 419-425.
79. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, Lok AS. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003,38: 518-526.
80. Weerasooriya VS, White FV, Shepherd RW..Hepatic fibrosis and survival in biliary atresia. *J Pediatr* 2004,144: 123-125.
81. Weiler-Normann C, Herkel J, Lohse AW.. Mouse models of liver fibrosis. *Z Gastroenterol* 2007,45: 43-50.
82. Wynn TA. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210.

83. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009,41: 263-272.
84. Yang CQ, Yang L, Yang WZ, Zhang Z, Zhang H, Chang YZ, Yuan M, Chen XM. [Mechanism of hepatic stellate cell migration during liver fibrosis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008,88: 119-122.
85. Zhang M, Guller S, Huang Y.. Method to enhance transfection efficiency of cell lines and placental fibroblasts. *Placenta* 2007, 28: 779-782.
86. Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005,11: 1753-1758.
87. Zhu L, Lu Y, Miller DD, Mahato RI. Structural and formulation factors influencing pyridinium lipid-based gene transfer. *Bioconjug Chem* 2008, 19: 2499-2512.
88. Zvibel I, Bar-Zohar D, Kloog Y, Oren R, Reif S.. The effect of Ras inhibition on the proliferation, apoptosis and matrix metalloproteases activity in rat hepatic stellate cells. *Dig Dis Sci* 2008, 53: 1048-1053.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)