



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ELISÂNGELA TRINDADE SANTOS

**IMUNOPATOGENIA DA FIBROSE SEPTAL INDUZIDA
POR *CAPILLARIA HEPATICA*: UM ESTUDO SOBRE O
PAPEL DOS MACRÓFAGOS**

Salvador, BA

2017

ELISÂNGELA TRINDADE SANTOS

**IMUNOPATOGENIA DA FIBROSE SEPTAL INDUZIDA
POR *CAPILLARIA HEPATICA*: UM ESTUDO SOBRE O
PAPEL DOS MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Zilton De Araújo Andrade

Co-orientador: Dr^a. Márcia Maria de Souza

Salvador, BA

2017

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo imensurável amor.

Ao prof. Dr. Zilton de Araújo Andrade, pela orientação contínua, competência; apoio e confiança.

À Dr^a Márcia pelos constantes ensinamentos, pelo excelente convívio e pela oportunidade de trabalhar sob sua supervisão.

Ao Dr. Thiago Almeida Pereira pela colaboração e pelo preciso apoio durante o desenvolvimento da tese.

À Ana Cristina Gonzalez pela competência, dedicação e espírito alegre que me auxiliaram em todas as etapas deste trabalho.” Sem você tudo teria sido mais difícil e menos divertido”.

À Mariana Guedes Martins Lobão “filhota” pela ajuda inestimável. Principalmente por sua amizade, bom humor e presença contínua durante todo trabalho ”muitos experimentos juntas!” Obrigada!!!!

Ao Sr. Antônio pelo incentivo e companheirismo durante o desenvolvimento de toda parte experimental.

Ao amigo Everton Batista pelo apoio constante, obrigada pelas dúvidas esclarecidas, disponibilidade e incentivo.

A todos os amigos do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) pela compreensão e carinho.

À Dr^a.Sônia Gumes Andrade e aos colegas do Laboratório de LACEI, pela cooperação e todos os seus ensinamentos.

Às amigas: D.Dinalva, Fátima e Andreia Carvalho pelo apoio e amizade.

À amiga Jurema Carrilho pela atenção, companheirismo e afeto.

À Dr^a. Elaine Cabral Albuquerque e a todos os funcionários da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia pelo apoio durante o desenvolvimento de toda parte experimental.

À Dr^a. Patrícia Sampaio Tavares Veras pela contribuição na realização dos trabalhos de biologia molecular.

Aos colegas e funcionários do Instituto de Ciências da Saúde ICS pela cooperação.

Ao Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) pela disponibilidade na elaboração das PCRs.

Às Plataformas de Microscopia Eletrônica, Citometria e PCR pela contribuição e gentileza.

Ao Sr. Florisvaldo pelo incentivo durante o desenvolvimento de toda parte experimental.

Às funcionárias Dilcea, Aline e Juciara pelo profissionalismo e gentileza.

À estudante de mestrado Kércia Pinheiro Cruz pela cooperação e boa vontade em inúmeras ocasiões.

Ao Dr^o. Carlos Eduardo pela cooperação e excelentes sugestões.

Às bibliotecárias do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelo profissionalismo e gentileza.

Ao Laboratório de Histotecnologia pelo auxílio na elaboração dos blocos e lâminas utilizados.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica: Dr^a. Adriana Lanfredi Rangel, Cláudio Pereira Figueira e a Dr^a. Lúcia Moreno pela inestimável ajuda na realização do estudo ultraestrutural e morfometria.

Ao Biotério pelo cuidado e manutenção dos animais de experimentação.

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Imunologia (PPGIM) pelo companheirismo e incentivo.

Aos colegas e funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela compreensão e atenção.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Os homens com autoconfiança vêm,
veem e vencem”.

Ahad Haam

Fontes de financiamento:

FAPESB, CNPQ e FIOCRUZ/CPqGM

RESUMO

A fibrose septal pode ser considerada como uma alteração não específica do fígado a diversos agentes, e o mecanismo envolvido no estabelecimento deste tipo de fibrose parece ser semelhante em diferentes modelos experimentais. Este tipo de fibrose pode ocorrer em várias doenças crônicas do fígado, inclusive em infecções causadas pelo helminto *Capillaria hepatica*. Semelhante aos outros processos fibróticos, a fibrose septal induzida pela infecção com *C.hepatica* envolve diversas células como: hepatócitos, células estreladas hepáticas, fibroblastos e macrófagos. Quando ativados, os macrófagos sofrem modificações induzidas por mediadores e podem polarizar em dois tipos celulares: macrófagos pró-inflamatórios M1(classicamente ativados) e macrófagos anti-inflamatórios M2 (alternativamente ativados). Os macrófagos teciduais hepáticos são capazes de ativar células estreladas potencializando o processo de inflamação e/ou reparo. Diante desses aspectos, este estudo avaliou o papel dos macrófagos na promoção da fibrose septal induzida pelo helminto *C.hepatica*. Para alcançar estes objetivos, foram realizados estudos *in vivo* com ratos Wistar e estudos *in vitro* com macrófagos primários de rato. No estudo *in vivo* foram utilizados 95 ratos Wistar de ambos os sexos, que foram subdivididos nos seguintes grupos: Grupo I animais sensibilizados com extrato de verme e de ovo e ovo+verme de *C. hepática*. Grupo II animais infectados com *C.hepatica* e tratados com cloreto de gadolínio (GdCl₃). Grupo III animais infectados com *C.hepatica* e tratados com Diclorometileno Difosfonato (Cl₂MDP). Para o estudo *in vitro* macrófagos peritoneais de rato foram sensibilizados com 20µg/mL do extrato proteico de *C. hepatica* (do ovo imaturo, do verme e ovo+verme) ou o mesmo volume de PBS ou LPS por 6 e 24 horas e avaliados quanto à expressão de TNF-α e Arg-1. Os resultados obtidos demonstraram que os extratos de *C. hepatica* isolados ou em conjunto falharam em produzir fibrose septal em ratos. Constatou-se também que o GdCl₃ não foi uma boa alternativa para depleção de macrófagos no modelo de capilaríase. Entretanto o tratamento de ratos com o Cl₂MDP foi capaz de depletar mais de 80% dos macrófagos. Os animais infectados com *C.hepatica* e tratados com Cl₂MDP apresentaram menor ativação de células estreladas/miofibroblastos e consequentemente desenvolveram menos fibrose septal em relação aos controles. Os estudos *in vitro* demonstraram que os extratos do ovo e do verme *C. hepática* induzem a produção da citocina pró-inflamatória TNF-α e a expressão do marcador de macrófagos alternativamente ativados Arginase-1. Diante destes resultados pode-se concluir que macrófagos são importantes para o estabelecimento da fibrose septal induzida por *C. hepática* e que o extrato do ovo induz a ativação alternativa de macrófagos, orquestrando o reparo fibrogênico hepático.

Palavras chave: Fibrose septal hepática, *Capillaria hepatica*, Macrófagos, Miofibroblasto

ABSTRACT

Septal fibrosis can be considered as a nonspecific alteration of the liver to several agents, and the mechanism involved in establishing this type of fibrosis appears to be similar in different experimental models. This type of fibrosis can occur in several chronic liver diseases, including infections caused by the helminth *Capillaria hepatica*. Similar to other fibrotic processes, septal fibrosis induced by infection with *C. hepatica* involves several cells such as: hepatocytes, hepatic stellate cells, fibroblasts and macrophages. When activated, macrophages undergo mediator-induced modifications and may polarize into two cell types: pro-inflammatory macrophages M1 (classically activated) and M2 (alternatively activated) anti-inflammatory macrophages. Hepatic tissue macrophages are able to activate stellate cells by potentiating the process of inflammation, and / or repair. In view of these aspects, this study evaluated the role of macrophages in the promotion of septal fibrosis induced by helminth *C.hepatica*. To achieve these objectives, *in vivo* studies with Wistar rats and *in vitro* studies with primary rat macrophages were carried out. In the *in vivo* study, 95 Wistar rats of both sexes were divided into the following groups: Group I animals sensitized with extract worm, extract egg and extract egg + worm of *C. hepatica*. Group II animals infected with *C. hepatica* and treated with gadolinium chloride (GdCl₃). Group III animals infected with *C.hepatica* and treated with Dichloromethylene Diphosphonate (Cl₂MDP). For the *in vitro* study, rats peritoneal macrophages were sensitized with 20 µg / mL of the protein extract of *C. hepatica* (from immature egg, worm and egg + worm) or the same volume of PBS or LPS for 6 and 24 hours and evaluated for expression of TNF-α and Arg-1. The results showed that extracts of *C. hepatica* alone or in combination failed to produce septal fibrosis in rats. It was also found that GdCl₃ was not a good alternative for macrophage depletion in the capillariasis model. However, treatment of mice with Cl₂MDP was able to deplete more than 80% of macrophages. Animals infected with *C. hepatica* and treated with Cl₂MDP showed lower activation of stellate cells / myofibroblasts and consequently less septal fibrosis in relation to the controls. *In vitro* studies have demonstrated that egg extracts and *C.hepatic* worm induce the production of the pro-inflammatory cytokine TNF-α and the expression of the activated macrophages marker Arginase-1. From these results it can be concluded that macrophages are important for the establishment of septal fibrosis induced by *C. hepatica* and that the extract of the egg induces an alternative activation of macrophages, orchestrating the hepatic fibrogenic repair.

Key words: Hepatic septal fibrosis, *Capillaria hepatica*, Myofibroblasts, Macrophages.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALD – Doença hepática alcoólica

AP1 - Proteína Ativadora 1

C.hepatica – *Capillaria hepatica*

CCL21 – Quimiocina 21

CCl4 – Tetracloreto de Carbono

CEH – Célula estrelada hepática

Cl₂MDP – Diclorometileno bifosfonato

CXCL10 – Quimiocina 10

CXCL9 - Quimiocina 9

CXCR2- Receptor da quimiocina CXCL2

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

EGF - Fator de crescimento epidérmico

GAPDH – Gliceraldeído fosfatodesidrogenase

GdCl₃ – Cloreto de Gadolínio

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

IFN- α – Interferon alfa

IgE – Imunoglobulina E

IgG1 –Imunoglobulina G1

IL-1 β – Interleucina 1 Beta

IL4 – Interleucina 4

IL5 – Interleucina 5

IL9 – Interleucina 9

IL13 – Interleucina 13

KLF4 – Fator de transcrição Kruppel

LPS - Lipopolissacarídeo

M1 – Macrófagos classicamente ativados

M2- Macrófagos Alternativamente ativados

MAP Quinase - Mitógeno ativador de proteína quinase

M-CFS – fator estimulador de colônia de macrófagos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1

MEC - Matriz extracelular;

MMP -Metaloproteinase de matriz

NFkB – Fator Nuclear Kappa B

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaqueta

PPAR γ – Receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama

RANTES- Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted

RNA - ácido ribonucléico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TGF β – Fator de transformação do crescimento beta

Th1- T helper 1

Th2 – T helper 2

TLR – Toll like receptors

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

α -SMA - alfa-actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica.....	38
Tabela 2. Sequências dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real (SYBR green) para rato.....	42
Figura 1- Ciclo do <i>Capillaria hepatica</i>	20
Figura 2- Desenho experimental do estudo <i>in vitro</i> . Estimulação de macrófagos primários com extratos proteicos de <i>C. hepatica</i>	40
Figura 3. Sensibilização intravenosa de ratos com extrato de ovo, verme e ovo+verme de <i>Capillaria hepatica</i> . Tecido corado com hematoxilina e eosina (H&E).....	49
Figura 4. Sensibilização intravenosa de ratos com extrato de ovo, verme e ovo+verme de <i>Capillaria hepatica</i> . Tecido corado com Picrosírius-vermelho.....	50
Figura 5. Fígado de ratos sensibilizados intravenosamente com extrato de ovo, verme e ovo+verme de <i>Capillaria hepatica</i> . Imunomarcção anti-CD68.....	51
Figura 6. Fígado de ratos sensibilizados intravenosamente com extrato de ovo, verme e ovo+verme de <i>Capillaria hepatica</i> . Imunomarcção anti- α -SMA.....	52
Figura 7. A- Fígado de ratos tratados intravenosamente com GdCl ₃ (10mg/Kg) corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).....	53
Figura 8. Fígado de ratos tratados intravenosamente com GdCl ₃ (10mg/Kg) corados com Picrosírius-vermelho.....	54
Figura 9. Fígado de ratos tratados intravenosamente com GdCl ₃ (10mg/Kg) corados imunomarcção com CD-68	55
Figura 10. Fígado de ratos tratados intravenosamente com diclorometileno difosfonato (CL ₂ MDP 1mg/mL) corados com hematoxilina e eosina (H&E).....	56

Figura 11. Fígado de ratos tratados intravenosamente com CL ₂ MDP Fígado corado com Picrosírius-vermelho.....	57
Figura 12. Fígado de ratos tratados intravenosamente com Cl ₂ MDP. Imunomarcção anti- α -SMA.....	58
Figura 13. Fígado de ratos tratados intravenosamente com Cl ₂ MDP. Imunomarcção anti- α -CD68.....	59
Figura 14. Quantificação relativa da expressão gênica (mRNA) de TNF- α por Real Time PCR.....	60
Figura 15. Quantificação relativa da expressão gênica (mRNA) de Arginase-1 por Real Time PCR.....	61

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Fibrose Septal Hepática	15
2.2	<i>Capillaria hepatica</i>	18
2.3	Células Estreladas Hepáticas CEHs	21
2.4	Macrófago e Fibrogênese	24
2.5	Depleção de Macrófagos	29
3.	OBJETIVOS	32
	Objetivo Geral	32
	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Grupos Experimentais	33
4.2	Elaboração dos Lipossomas	36
4.3	Eutanásia e Coleta de Soro	37
4.4	Histopatologia	37
4.5	Imuno-histoquímica	37
4.6	Morfometria	38
4.7	Contagem de Células	38
4.8	Extratos Proteicos e Quantificação de Endotoxina	38
4.9	Aquisição de Macrófagos Primários	39
4.10	Experimentos <i>In vitro</i>	39
4.11	Considerações Éticas	40
1		42
5.	RESULTADOS	43
5.1	Sensibilização com Extratos de Ovo e de Verme de <i>C.hepatica</i>	43
5.2	Depleção macrofágica com Cloreto de Gadolínio(GdCl ₃)	44
5.3	Depleção macrofágica com Diclorometileno Difosfonato (Cl ₂ MDP)	46
5.4	Experimentos <i>In vitro</i>	48
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A fibrose septal pode ser considerada como uma alteração não específica do fígado a diferentes agentes, e o mecanismo envolvido no estabelecimento deste tipo de fibrose parece ser semelhante em diferentes modelos (ANDRADE, 2008; ZHOU et al., 2014). Este tipo de fibrose pode ocorrer em várias doenças crônicas do fígado, inclusive em infecções causadas pelo helminto *Capillaria hepatica* (GALBER & VERNACE, 1974; SOUZA et al., 2006).

A fibrose septal e as lesões parasíticas induzidas pela capilariase seguem linhas de evolução independentes (OLIVEIRA & ANDRADE, 2001). Da mesma forma que outros processos fibróticos, a fibrose septal induzida pela infecção com *C.hepatica* envolve diversas células como: hepatócitos, células estreladas hepáticas, fibroblastos e os macrófagos que também participam do estabelecimento da fibrogênese (FONSECA et al., 2005). No tecido hepático normal as células estreladas hepáticas (CEHs) são responsáveis pelo acúmulo e transporte de retinóides (Vitamina A) (FRIEDMAN et al. 1989; MAHER et. al. 1993).

A fibrogênese induz mudanças na expressão gênica das células do parênquima hepático. Nesse contexto, uma das principais mudanças ocorridas em resposta a uma agressão contínua é a ativação de células produtoras de matriz extracelular (BACHEM et al., 1992; MELTON et al., 2007). Diversos estudos já demonstraram que a principal célula responsável pela síntese de material conjuntivo no parênquima hepático é a célula estrelada hepática (CEH). Inicialmente, a ativação das células estreladas parece ser causada por estímulos parácrinos de células vizinhas, incluindo células do endotélio sinusoidal, células de Kupffer e hepatócitos (JARNAGIN et al.,1994).

Outra célula importante neste processo são os macrófagos, os quais podem ser ativados por vários estímulos, incluindo elementos microbianos, receptores celulares, citocinas e outros mediadores químicos. Quando ativados, os macrófagos sofrem modificações induzidas por esses mediadores e podem polarizar em dois tipos celulares: macrófagos pró-inflamatórios

M1(classicamente ativados) e macrófagos anti-inflamatórios M2 (alternativamente ativados) (LEE et al., 2015., YOU et al., 2013).

Macrófagos teciduais hepáticos (células de Kupffer) exibem uma ativa participação na resposta imune. Estes são capazes de ativar células estreladas potencializando o processo de inflamação e/ou reparo tecidual. Além das células de Kupffer, os monócitos circulantes também são recrutados para o local da lesão (LIASKOU et al., 2013).

A depender do estímulo, as células de Kupffer também se diferenciam em macrófagos clássicos ou alternativos. Em infecções parasitárias existem um predomínio de células de Kupffer M2 e estas auxiliam no processo de reparo produzindo citocinas regulatórias incluindo a IL-10 (MANTOVANI et al., 2013). Estudos que utilizaram o tetracloreto de carbono (CCl4) como modelo experimental de fibrose hepática, revelaram que, neste modelo, houve um aumento na quantidade de macrófagos M2 na área lesada, indicando assim a participação destas células na progressão da fibrose hepática (HIRONAKA et al., 2000).

Diante desses aspectos, o estudo da participação dos macrófagos e das células estreladas hepáticas na promoção da fibrose induzida por *C.hepatica* e a nossa de abordagem metodológica, podem contribuir para o melhor entendimento da imunopatogenia da fibrose septal hepática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fibrose Septal Hepática

A fibrose septal hepática, assim como outros tipos de fibrose, é caracterizada pelo depósito excessivo de componentes da matriz extracelular em resposta à agressões persistentes (HERNANDEZ-GEA & FRIEDMAN, 2011). Entretanto, a fibrose septal é assinalada pela depósito de estroma conjuntivo entre os hepatócitos, gerando finos septos fibrosos que se espalham ao longo do parênquima hepático, e estende-se de uma zona portal para outra zona portal conectando os espaços-porta entre si, ou do espaço porta para a veia central e outras combinações (LEMOS et al., 2003; ASSIS et al., 2004; SOUZA et al., 2006; GALVÃO et. al.,1981).

No tecido hepático normal, a matriz extracelular se apresenta como uma rede estrutural que sustenta as células do parênquima. Essa intrincada rede possui fibras elásticas, colágenas, proteínas multiadesivas (fibronectina e lamina) e glicosaminoglicanos (SCHUPPAN et al., 2001). Todo esse conjunto de moléculas proporciona ao tecido hepático suporte mecânico e estrutural exercendo grande influência na comunicação celular. Devido a sua grande importância para o funcionamento adequado do sistema hepático, agentes que causem mudanças na composição da matriz extracelular podem comprometer o funcionamento do órgão (MCGUIRE et al., 1992; ARRIAZU et al., 2014). O dano ao tecido hepático causa mudanças na composição da matriz extracelular e diante de agentes lesivos, a matriz passa a produzir uma isoforma específica de fibronectina a qual está relacionada com a ativação de células produtoras de matriz extracelular. O colágeno tipo I é um dos principais constituintes da matriz extracelular no tecido hepático fibrótico, e sua expressão é regulada tanto de forma transcricional como pós-transcricional (MARILIIS et al., 2016; FREIDMAN, 2008).

No fígado, a fibrose ocorre quando os hepatócitos sofrem lesões contínuas ou são acometidos por reações imunes ou auto-imunes. Diversos fatores estão envolvidos na progressão da fibrose. Dentre estes, podemos

destacar a estimulação e ativação de vários mecanismos celulares e moleculares como: citocinas e fatores de crescimento, os quais regulam a síntese de componentes da matriz extracelular. Em estágios avançados a fibrose hepática apresenta vários tipos de colágeno e outros componentes da MEC inclusive colágeno, fibras elásticas e microfibrilas associadas a elastina (BANSAL & FRIEDMAN 2006, IREDALE et al., 2008).

A fibrose septal pode ser considerada como uma alteração não específica do fígado a diferentes agentes e o mecanismo envolvido no estabelecimento deste tipo de fibrose parece ser semelhante em diferentes modelos (IREDALE, 2007). Geralmente, sua fase inicial é caracterizada por uma reação inflamatória seguida de proliferação fibroblástica, aparecimento de células mononucleares, proliferação ductular, acompanhada por depósito excessivo de colágeno, seguida pela formação de septos celulosos no parênquima hepático, modificando a arquitetura normal do tecido hepático, interferindo assim diretamente na sua atividade funcional (CAREY & CAREY, 2010; ANDRADE, 2008). A fibrose septal pode ocorrer em várias doenças crônicas do fígado, tais como: cirrose septal incompleta (BARNETT *et al.*, 1992), hepatite crônica septal e na resposta induzida pelo *Capillaria hepática* (GALBER & VERNACE, 1974).

Estudos utilizando administração de soro de porco como modelo experimental de indução de fibrose septal em ratos revelaram que este tipo de fibrose possui uma base imunológica. A manifestação de fibrose septal no modelo do soro do porco e no da capilariase parece ser a mesma, sugerindo que o mecanismo de indução seja semelhante nestes modelos (BUNCHET *et al.*, 1996).

Para melhor caracterizar o modelo de fibrose septal hepática induzida por *C. hepatica* em ratos, uma série de resultados obtidos por nosso grupo é listado a seguir numa tentativa de estabelecer as principais características do modelo: a) O estudo vascular com injeções de solução de tinta da Índia demonstrou que o septo fibroso portal contem predominantemente vasos portais que drenam diretamente para dentro dos sinusóides; b) Os septos iniciais, após três semanas da infecção, são predominantemente celulares, com células mesenquimais.

Adicionalmente há proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e de ductos biliares bastante proeminentes. Após quatro meses, os colágenos de tipo I e III predominam. De seis meses em diante, ocorre uma mudança no aspecto dos septos fibrosos, que se tornam mais finos e mais escassos, o que coincide com o sequestro dos ovos dentro das lesões focais, este processo parece levar à perda da antigenicidade dos mesmos e da capacidade de embrionar. Alguns septos e alguns ovos ainda persistem após um ano da infecção, mas a maioria deles aparece nas colorações histológicas de rotina como ovos vazios; c) Estes septos remanescentes aparecem após injeção de tinta da Índia como septos condutores, o que possivelmente pode explicar a sua permanência no parênquima devido à sua funcionalidade; d) A patogênese da fibrose septal hepática induzida por *C. hepatica* tem permanecido obscura até o momento (ASSIS et al., 2004; SOUZA et al., 2006; GOMES et al., 2006).

Pode-se especular que algum fator ou fatores são liberados durante a formação das lesões parasíticas focais que estimulam células no espaço portal a proliferarem e formarem os septos fibrosos. Tal fator ou fatores ainda não foram identificados. Experimentos realizados com injeções de extratos de fígados infectados com *C. hepatica* ou injeções de ovos imaturos diretamente dentro do fígado ou dentro da cavidade peritoneal conduziram a resultados negativos (SANTOS et al., 200; FERREIRA et al., 1993,).

A fibrose septal e as lesões parasíticas induzidas pela capilaríase seguem linhas de evolução independentes indicativas possivelmente, de diferentes patogêneses. É possível aumentar as lesões parasitárias por uma estimulação antigênica externa ou reinfecções, bem como diminuí-las pelo uso de tratamento com esteróides sem interferir com o tipo e quantidade de fibrose septal presente (SANTOS et al., 2001). Em ratos submetidos à repetidas infecções com *C. hepatica*, o número de lesões parasíticas focais aumenta, mas a fibrose septal permanece inalterada (OLIVEIRA & ANDRADE 2001; SOUZA et al., 2006).

De maneira semelhante a outras infecções parasitárias, a capilaríase também é mediada pela ativação de células T helper 2 (Th2), as quais induzem

a produção de citocinas como: IL-5, IL-9, IL-13 e IL-4 (MCSORLEY & MAIZELS, 2012). Infecções helmínticas desencadeiam respostas diferentes a depender das características biológicas do parasito, entretanto a maioria aciona respostas imunológicas semelhantes. Esta resposta frequentemente inclui citocinas do tipo Th2, além de eosinofilia, basofilia e níveis elevados de IgE e IgG1. Alguns parasitas como a *C. hepatica* podem causar lesão tecidual podendo produzir reações granulomatosas ou fibróticas. (REIMAN et al., 2006).

2.2 *Capillaria hepática*

O *Capillaria hepatica* é um parasito nematódeo que atinge várias espécies de mamíferos, sendo os roedores os principais hospedeiros naturais. (SOLOMON & HADLEY, 1971; FUEHRER et al., 2011).

Este helminto foi inicialmente descrito por Bancroft (1893) com o nome de *Trichocephalus hepaticus* devido a sua semelhança com o *Trichocephalus trichuris*, sendo mais tarde classificado como *Hepaticula hepatica*. Contudo, foi Baylis em 1931, que em um experimento de recuperação de vermes adultos do tecido hepático, classificou o gênero *Capillaria* como *Capillaria hepatica*.

Capillaria hepatica é um parasito cosmopolita, tendo sido relatado em vários países, de climas e condições ambientais bem diferentes, desde regiões geladas do Canadá até as regiões tropicais da África. Observa-se alta prevalência de infecção em ratos capturados na cidade de Salvador, Bahia, bem como em outras cidades do Brasil e do mundo. Existem poucos relatos de casos humanos de capilaríase (GALVÃO 1981; DA ROCHA et al., 2015).

Estudos sobre a morfologia e aspectos biológicos do verme são difíceis de serem obtidos, pois devido a sua estrutura longa, fina e delicada a obtenção de vermes inteiros é extremamente trabalhosa. Mesmo diante destas dificuldades um detalhado estudo sobre a biologia do verme foi realizado por Wright em 1961. Neste estudo ele caracteriza os vermes deste helminto da seguinte forma: apresentam simetria bilateral, corpo não segmentado, cilíndrico,

revestido por cutícula e apresentam dimorfismo sexual. Os ovos de *Capillaria hepática* possuem forma oval, casca dupla com estrias na casca externa e rolhas polares sem protuberâncias (EL NASSERY et al., 1996).

O ciclo do *C. hepatica* é direto, necessitando somente de um hospedeiro, o qual abriga ovos e vermes adultos no fígado. A infecção por *C. hepatica* dá-se pela ingestão de ovos embrionados, os quais vão eclodir ao nível do ceco (FARHANG-AZAD, 1977). As larvas liberadas desses ovos migram através do sistema porta para o fígado, onde se desenvolvem até a fase adulta. Nas primeiras horas após a ingestão dos ovos embrionados, as larvas migram para o ceco, em poucos dias estas larvas migram através do sistema porta para o fígado. No fígado as larvas evoluem e atingem a maturidade sexual. Cerca de vinte dias após a infecção, as fêmeas se apresentam cheias de ovos. Com um mês de infecção, as fêmeas morrem liberando uma grande quantidade de ovos no parênquima hepático. Os machos morrem mais tarde, aproximadamente no quadragésimo dia pós-infecção (GALVÃO 1981; FERREIRA & ANDRADE 1993; ANDRADE et al., 2004).

Os ovos são liberados para o meio externo após a morte do hospedeiro; o processo de liberação dos ovos para o meio ambiente se dá pela desintegração da carcaça ou pelas fezes de algum predador que tenha se alimentado do animal infectado. Para que os ovos se tornem embrionados eles precisam permanecer em um ambiente adequado, com boas condições de luminosidade, umidade e temperatura. Uma vez no meio externo, os ovos precisam de aproximadamente um mês para se tornarem embrionados e infectantes (FARHANG-AZAD, 1977; EL NASSERY et al., 1996).

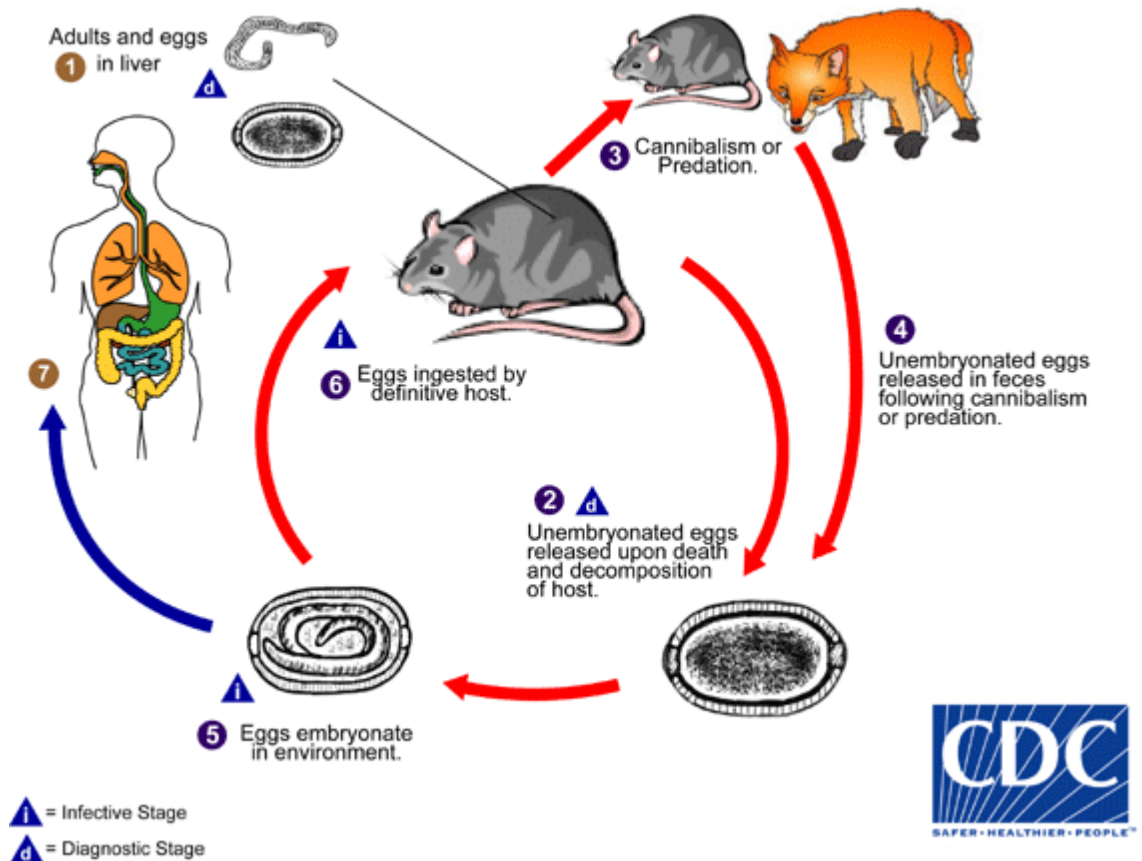


Figura 1 - Ciclo do *Capillaria hepatica*. CDC, 2012.

Nos primeiros dias de infecção não é possível notar alterações histológicas no tecido hepático. Já na segunda semana de infecção, observam-se vermes jovens e um discreto infiltrado inflamatório. Na terceira semana, são observados vermes adultos acompanhados de uma intensa resposta inflamatória com muitos polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (GALVÃO,1981).

A infecção experimental utilizando *C. hepatica* como modelo de fibrose hepática se apresenta como um modelo valioso e interessante para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fibrogênese.

2.3 Células estreladas hepáticas CEHs

A fibrogênese induz mudanças na expressão gênica das células do parênquima hepático, o que gera alterações nos níveis de citocinas e quimiocinas (BACHEM et al., 1992). Esses estímulos geram alterações moleculares nas células do fígado. Na fibrogênese hepática uma das principais mudanças ocorridas em resposta a uma agressão contínua é a ativação de células produtoras de matriz extracelular (MELTON et al., 2007). Neste contexto a principal célula responsável pela síntese de matriz extracelular no parênquima hepático é a célula estrelada hepática (CEH). Inicialmente a ativação das células estreladas parece ser causada por estímulos parácrinos de células vizinhas, incluindo células do endotélio sinusoidal, células de Kupffer e hepatócitos (JARNAGIN et al., 1994).

Desde o seu descobrimento, em 1876, as células estreladas têm confirmado sua importância para a manutenção do tecido hepático. Diversos estudos têm comprovado a versatilidade e relevância desta célula durante os processos de reparo e fibrose. Com o passar dos anos, novas técnicas de caracterização utilizando recursos de biologia celular e molecular facilitaram a identificação e caracterização das células estreladas (FRIEDMAN, 2008).

Diversos estudos demonstraram que além de hepatócitos, células estreladas hepáticas, fibroblastos e os macrófagos também participam do estabelecimento da fibrogênese hepática (SENOO et al., 2010). No tecido hepático normal as células estreladas são responsáveis pelo acúmulo e transporte de retinóides (Vitamina A). Estes retinóides se acumulam no citoplasma da célula formando gotas lipídicas; entretanto, ao serem ativadas estas células perdem as gotas lipídicas e aumentam a síntese de matriz extracelular. (FRIEDMAN et al. 1989; MAHER et al., 1993).

No parênquima hepático as células estreladas estão em íntimo contato com as células que compõem o tecido; esta interação celular é importante para a manutenção da homeostase do órgão. A interação entre as CEHs e as células

do sistema imune também é importante para o estabelecimento da resposta do tecido hepático aos agentes lesivos (SAFADI et al., 2004; YU et al., 2004). Estas células também parecem ser importantes para desenvolvimento dos ductos biliares intrahepáticos. Estudos demonstram interações entre células do epitélio biliar e células estreladas (LIBBRECHT et al., 2002).

O processo de ativação da célula estrelada hepática é caracterizado por uma alteração fenotípica, gerando uma mudança na função celular, ou seja a célula estrelada passa de uma célula armazenadora de vitamina A para uma célula com características contráteis e fibrogênicas similares aos miofibroblastos (BABA et al., 2004). A ativação das células estreladas hepáticas pode ser induzida por produtos sintetizados por células vizinhas, incluindo células de Kupffer, células do endotélio sinusoidal e os próprios hepatócitos. Em estágios iniciais da lesão hepática, as células endoteliais estimulam a produção de fibronectina, a qual por sua vez funciona como agente ativador de células estreladas. Células endoteliais também participam na conversão de TGF- β inativo para a forma ativa (JARNAGIN et al., 1994). Apesar de outras populações celulares contribuírem para a produção de matriz extracelular durante o dano hepático, são as células estreladas as principais participantes da fibrogênese. Durante a ativação das CEHs há um aumento na expressão de mitógenos hepáticos, incluindo o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidérmico, epimorfina e pleiotrofina (BACHEM et al., 1992; ZARET et al., 2002). Produtos da ativação das células estreladas como o TGF β e o fator de crescimento epidérmico (EGF Epidermal Factor Growth) parecem ser requeridos para regeneração hepática. Estes fatores de crescimento induzem mitose nas células estreladas hepáticas, criando assim um ambiente autócrino. (MAHER et al., 1993).

Essa ativação é controlada por fatores de transcrição como as proteínas da família AP-1 (proteína ativadora-1), fator Jun D, fator nuclear kB (NF-kB) e sinalização intracelular com a participação de moléculas como: Smad, Ras e proteínas ativadas por mitógenos MAP. As células de Kupffer também induzem a produção de proteína quimiotática de monócitos MCP-1, osteopontina e PDGF,

os quais estão envolvidos na ativação das células estreladas hepáticas (JOCHUM et al., 2001, KALINICHENKO et al., 2003). A CEH ativada passa a expressar genes relacionados à fibrose incluindo α -actina de músculo liso (α SMA), receptores para TGF β , e metaloproteinases. Também ocorrem alterações em receptores de membrana, em particular nas integrinas, as quais estão envolvidas em processos de ativação e migração celular. As CEHs migram para o local lesado pela ação de quimioatraentes (MCP-1 e CXCR2) (KALINICHENKO et al., 2003; SMART et al., 2006).

No início do processo de ativação das CEHs, há um aumento na expressão de receptores de TGF β o qual por sua vez auxilia na indução do fenótipo contrátil das CEHs. Os primeiros estímulos estão relacionados com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por hepatócitos e colangiócitos lesados (NIETO et al., 2002).

A CEH participa de forma ativa no processo imuno-regulatório do tecido hepático (MAHER, 2001). Durante sua ativação, estas células podem amplificar a resposta inflamatória através da produção de citocinas e quimiocinas, incluindo MCP1 CCL21 RANTES e TGF β (MARRA et al., 2000; SCHWABE et al., 2003). A produção de TGF β (fator de crescimento transformador beta) pelas células estreladas exerce um potente efeito fibrogênico. Receptores para este fator de crescimento têm sido extensivamente caracterizados nestas células (GRESSNER et al., 2002). O TGF β é caracterizado por induzir diferenciação e proliferação celular e seu aumento já foi documentado tanto na fibrose hepática experimental como na fibrose hepática humana (CASTILLA et al., 1991). Danos hepáticos de diferentes origens induzem a elevação da produção de TGF β inclusive nas células estreladas (BAUER et al., 1998). O TGF β é um dos principais estimuladores da produção de colágeno I e outros componentes da matriz extracelular, como fibronectina e proteoglicanos, e a estimulação destes componentes ocorre tanto de forma parácrina como autócrina (BREITKOPF et al., 2006).

Além disso, as células estreladas hepáticas expressam receptores do tipo Toll (Toll Like Receptors-TLR) que constituem uma família de receptores

envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares e geralmente estão associados a processos infecciosos. A expressão destes receptores pelas CEHs indicam a capacidade destas células em interagir com lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Esta função reforça a ideia de que as CEHs podem funcionar como células apresentadoras de antígeno, estimulando desta forma a proliferação de linfócitos (ANTHONY et al., 2010; WINAU et al., 2008).

As células estreladas hepáticas também produzem fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CFS) amplificando a resposta inflamatória durante o dano hepático (PINZANI et al., 2001). Macrófagos hepáticos (células de Kupffer) também contribuem para a ativação das células estreladas, induzindo a produção de matriz, proliferação celular e liberação da vitamina A (BILZER et al., 2006).

2.4 Macrófagos e fibrogênese

Na fibrogênese os macrófagos têm se mostrado cruciais na mediação da inflamação hepática, iniciando o processo fibrótico. Durante o dano hepático, estas células são induzidas a produzir citocinas pró-inflamatórias como: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MCP-1. Células imunes adicionais também são recrutadas (FRIEDMAN, 2008; WYNN et al., 2010; TAN et al., 2009).

Macrófagos são células resultantes da diferenciação celular de monócitos em resposta a estímulos endógenos ou exógenos. Este processo de ativação está relacionado a alterações quantitativas na expressão de várias citocinas gerando modificações fenotípicas e genotípicas, o que leva a célula a adquirir ou intensificar diversas características a exemplo da adesão, migração e mudanças em receptores específicos (LUCAS et al., 2010). Durante a fibrogênese existe uma complexa interação entre diferentes células. Além disso, lesões ao tecido hepático ativam uma série de mediadores que induzem o recrutamento de células inflamatórias incluindo os macrófagos circulantes. (FRIEDMAN, 2003; HERNÁNDEZ-GEA et al., 2012).

Os macrófagos constituem o sistema fagocitário mononuclear ou sistema reticuloendotelial, o qual compreende macrófagos livres e fixos em tecidos; os

macrófagos livres são recrutados para o local da lesão, já os macrófagos teciduais são originados de células progenitoras desde a fase embrionária (YONA et al., 2013). Estas células apresentam-se de diferentes formas e propriedades. Os fagócitos mononucleares surgem de um precursor comum na medula óssea. Geralmente apresentam núcleo reniforme, são ricos em lisossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático granular. Possuem receptores Fc, os quais se ligam a regiões constantes dos anticorpos estimulando a atividade fagocítica. *In vitro* estas células possuem forte adesão ao vidro e, além disso, expressam marcadores na membrana, o que possibilita sua identificação por imuno-histoquímica. (LIASKOU et al., 2013; MARTIN 2014).

A depender da sua localização e estado funcional, os macrófagos podem ser heterogêneos quanto à presença de receptores, morfologia e produção de moléculas (HOLT & CHANG, 2008). Estudos recentes demonstram a importância destas células no processo de reparo tecidual. Macrófagos residentes no tecido hepático são oriundos de células progenitoras geradas durante a embriogênese. Em adultos, estas células também podem ser recrutadas durante a ação de agentes lesivos, através de fatores de crescimento. No fígado lesado, as muitas alterações entre os receptores de quimiocinas possuem um papel crucial no tráfego destas células. (YONA et al., 2013).

Os macrófagos podem ser ativados por vários estímulos, incluindo elementos microbianos, receptores celulares, citocinas e outros mediadores químicos. Quando ativados, os macrófagos podem sofrer modificações induzidas por esses mediadores. (LEE et al., 2015). Esta estimulação pode ocorrer via receptores do tipo Toll e através de receptores de citocinas pró-inflamatórias. Durante a sua ativação, os macrófagos podem polarizar em dois tipos celulares: macrófagos pró-inflamatórios M1(classicamente ativados) e macrófagos anti-inflamatórios M2 (alternativamente ativados) (YOU et al., 2013). Entretanto, o papel destes macrófagos na patogênese da fibrose hepática ainda não está completamente esclarecido devido a sua grande heterogeneidade (WANG et al. 2014; HUANG et al., 2014).

Os macrófagos classicamente ativados (M1) estão relacionados com um perfil Th1 de resposta. Este tipo de resposta está fortemente relacionada com a produção de IFN- γ , TNF, IL6 TNF α , CXCL9, CXCL10. Os M1 podem agravar a resposta inflamatória devido à estimulação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e indução de apoptose (KAWARATANI et al., 2013; LEE et al., 2014; JU, 2015).

A polarização dos macrófagos é controlada por diferentes mecanismos moleculares que incluem vias de sinalização, fatores de transcrição e reguladores pós-transcricionais. Frente a uma resposta Th2, os macrófagos diferenciam-se em células anti-inflamatórias denominadas macrófagos alternativamente ativados (M2) (TIAN & CHEN, 2015). Este tipo celular contribui para o processo de fibrose e remodelagem tecidual. Além disso, os M2 são caracterizados pela presença de IL4 e IL13. Estudos recentes demonstram que os M2 podem se subdividir em M2a, M2b e M2c. O subtipo M2a parece estar envolvido em um ambiente onde as interleucinas 13 e 4 (IL13 e IL4) predominam, os M2b estão presentes em um ambiente contendo complexos imunes, lipopolissacarídeos (LPS) e o subtipo M2c parece ser característico em respostas imunes envolvendo TGF β e glucocorticóides. (MURRAY et al., 2014; BAECK et al., 2014; BISWAS e MANTOVANI, 2010). A caracterização molecular das populações de monócitos faz-se através da expressão de Ly6c. A Ly6c é uma glicoproteína de superfície celular utilizada para distinguir grupos de monócitos. Monócitos Ly6c^{high} parecem se diferenciar para células com perfil pró-inflamatório ou seja M1, já macrófagos Ly6c^{low} parecem estar relacionados com um perfil anti-inflamatório ou M2. (LIASKOU et al., 2013).

Os macrófagos que residem no fígado (as células de Kupffer), também pertencem ao sistema mononuclear fagocitário e participam ativamente do processo inflamatório (LUCKEY & PETERSEN, 2001). As células de Kupffer se localizam no lúmen, região subendotelial. Estas células emitem prolongamentos citoplasmáticos que permitem que elas estejam em íntimo contato com as células estreladas e com as outras células do parênquima hepático (LEE et al., 2015). Assim como outros macrófagos teciduais, tais células funcionam como

eliminadoras de substâncias estranhas do tecido hepático, contribuindo desta forma para elaboração da resposta imunológica. Também funcionam como células apresentadoras de antígeno ativando a resposta mediada por linfócitos T (ROGOFF et al., 1981). Desta forma estas células contribuem para a manutenção da tolerância imune do tecido hepático, pois o fígado é constantemente exposto a antígenos oriundos do intestino (JANNES & KUBES, 2013; HOLT & CHANG, 2008).

A identificação das células de Kupffer geralmente é realizada utilizando marcadores comuns de células fagocíticas. Sendo assim, essas células podem ser facilmente identificadas por imuno-histoquímica mediante a utilização de anticorpos monoclonais. Os anticorpos mais utilizados são os ED1 e ED2; estes marcadores reconhecem uma molécula na membrana lisossomal presente nesta população celular (ANTONIADES et al., 2012). Em condições normais, as células de Kupffer mantêm sua atividade fagocítica e participam do metabolismo das lipoproteínas e também atuam como células apresentadoras de antígeno; são capazes de desencadear uma resposta citotóxica quando expostas a células tumorais circulantes, podem também ser capazes de reconhecer e fagocitar glicoproteínas e glicoconjugados através de receptores específicos. Elas também interagem com hepatócitos participando na regulação do acúmulo de triglicerídeos no fígado (STIENSTRA et al., 2010).

Células de Kupffer fazem parte do conjunto de células imunocompetentes presentes no fígado. Como as demais células do sistema imune inato, elas também reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Elas são uma das primeiras células a entrarem em contato com os antígenos derivados do trato gastrointestinal que chegam ao fígado através da veia porta. Na fibrogênese hepática, as células de Kupffer exibem uma ativa participação na resposta imune inata e durante o estabelecimento da fibrose, pois promovem a ativação das células estreladas e também participam do processo de inflamação e reparo tecidual. Além das células de Kupffer, os monócitos circulantes também são recrutados para o local da lesão, estes parecem ser recrutados por quimiocinas específicas como a CCL2 (LIASKOU et al., 2013).

As células de Kupffer, assim como outros macrófagos, podem ser ativadas pela via clássica, que depende de produtos da resposta T helper 1 (Th1), principalmente do interferon gama (IFN- γ) ou pode ocorrer pela via alternativa, que geralmente está envolvida com a resposta T helper 2 (Th2), especialmente com as citocinas IL4 e IL13. (GORDON, 2003; DUFFIELD et al., 2005; WYNN & BARRON, 2010; FRIEDMAN, 2005). Saha et al (2015) em um estudo recente (2015) demonstraram que a polarização das células de Kupffer em M1, na doença hepática alcoólica parece ser estimulada pelo fator de transcrição Kruppel (KLF4). Outro estudo avaliando estágios iniciais da falência hepática aguda revelou que células de Kupffer com perfil M1 são ativadas por TNF α e IFN confirmando assim o papel hepatotóxico das células de Kupffer M1 neste processo.

Durante o dano hepático células de Kupffer M2 auxiliam no processo de reparo produzindo citocinas regulatórias incluindo a IL-10. (MANTOVANI et al., 2013). No início do processo fibrótico o acúmulo de matriz extracelular é dirigido por células estreladas hepáticas e fibroblatos locais. Estudos recentes têm demonstrado que a quantidade de macrófagos está intimamente relacionada com o aumento na expressão de citocinas pró-fibrogênicas como TGF β e PDGF. Sendo assim, estes fatores induzem a ativação e proliferação das células estreladas, promovendo assim um ambiente fibrótico. (HEYMANN et al., 2009). Estudos utilizando o tetracloreto de carbono (CCl₄) como modelo experimental de fibrose hepática, revelaram que neste modelo houve um aumento na quantidade de macrófagos M2 na área lesada, indicando assim a participação destas células na progressão da fibrose hepática (HIRONAKA et al., 2000).

Em alguns casos, incluindo a doença hepática alcoólica (ALD), esteato hepatite não alcoólica (NASH), hepatite alcoólica e carcinoma hepatocelular, os macrófagos parecem estar relacionados com o agravamento da doença, uma vez que nestes casos estas células apresentam um fenótipo clássico (M1), secretando citocinas pro-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, intensificando o dano celular (DEY et al. 2014; MANDREKAR 2011; KAWARATANI et al. 2013). Estudos recentes demonstram que durante a

infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) há um aumento significativo no número de células de Kupffer e nos níveis de TNF- α (KRESSE et al., 2005).

Lopes-Navarrete, em 2011 demonstrou que as células de Kupffer desempenham um importante papel no processo de reparo tecidual, contribuindo na dissolução da fibrina, remoção de tecidos mortos e no recrutamento de fibroblastos. Além disso, macrófagos alternativamente ativados parecem estar associados com altos níveis de vascularização. Quando alternativamente ativadas, estas células têm a capacidade de expressar arginase-1, IL-10 e outras moléculas que estão envolvidas na promoção do reparo tecidual (ALBINA et al., 1990). Os macrófagos alternativamente ativados são observados em uma variedade de infecções helmínticas, incluindo *Schistosoma mansoni*, *Taenia crassiceps*, *Fasciola hepatica* e *Ascaris sunn*. Estudos que utilizaram a infecção pelo *S.mansoni* como modelo experimental para estudo da fibrose, revelaram que durante a resposta Th2 há uma elevação nos níveis de arginase-1 (LOPES-NAVARRETE, 2011; KREIDER et al., 2007).

2.5 Depleção de macrófagos

Para melhor entender o mecanismo de ação dos macrófagos e o seu papel em processos biológicos, diversas metodologias são empregadas. Uma dessas metodologias é técnica de manipulação genética que produz animais com alterações na expressão de determinados genes: animais *knockout*, onde genes específicos são retirados ou silenciados (HALL et al., 2009). Esta técnica é eficaz em produzir animais deficientes em determinadas proteínas ou células, entretanto esta metodologia não é comumente utilizada devido a sua complexidade e custo elevado. Sendo assim, modelos de depleções celulares são uma alternativa simples e acessível para o estudo da função celular (VOGEL, 2014; SIKORSKI & PETERS, 1997; ZHU et al., 2015).

Diferentes substâncias são utilizadas para reduzir a função fagocítica dos macrófagos. Estas substâncias há muito tempo vêm sendo empregadas em estudos experimentais com o objetivo de entender o mecanismo e o papel de células fagocíticas nos processos patológicos. O cloreto de gadolínio (GdCl₃) por

muito tempo foi utilizado como droga de escolha para depletar macrófagos (RAI et al., 1991, ROSE et. al., 2001). O cloreto de gadolínio é um lantanídeo terra rara comumente utilizado como contraste para exames de ressonância magnética (ROGOSNITZKY & BRANCH 2016). Entretanto, quando utilizado experimentalmente em modelos animais, age bloqueando a função fagocítica de macrófagos (ZHU et al., 2015). Apesar de bloquear função fagocítica dos macrófagos, o cloreto de gadolínio não é capaz de promover a eliminação dos macrófagos. Desta forma, logo surgiram outras técnicas mais eficazes em eliminar este tipo celular.

Um modelo experimental atualmente utilizado é a administração endovenosa do diclorometileno bifosfonato (Cl_2MDP), também conhecido como clodronato (RANG et al., 2001; SNOEYS et al., 2006). Os Cl_2MDP são estruturalmente análogos ao pirofosfato, um produto normal do metabolismo humano, e possuem uma meia vida curta em torno de duas horas. Este fármaco afeta o metabolismo do cálcio e usualmente é utilizado no tratamento de doenças ósseas e do metabolismo de cálcio. São caracterizados pela presença de átomos de carbono na cadeia alifática da molécula e grupos aminoterminais na cadeia lateral. Diversos estudos demonstram que este fármaco atua como um regulador de cálcio. Sendo assim, atua diretamente na reabsorção e mineralização óssea (FLEISCH, 2000; TENENBAUM et al., 2002).

Devido a sua ação capacidade de afetar o metabolismo ósseo, os bifosfonatos são usados no tratamento de doenças ósseas, tais como osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia de várias etiologias e em neoplasias malignas. Além disso, são utilizados em procedimentos de cintilografia óssea. Podem ser administrados por via oral ou intravenosa. Em modelos experimentais, o Cl_2MDP é utilizado como método para a depleção de macrófagos (KESTEREN-HENDRIKX, 2003).

Diclorometileno bifosfonato ou clodronato, quando encapsulado em lipossoma, induz apoptose em macrófagos. Este fármaco precisa ser encapsulado em lipossomas, pois em sua forma livre é incapaz de atravessar a membrana plasmática. Quando fagocitados pelos macrófagos, os lipossomas

contendo o ^{125}I MDP, sofrem ação das fosfolipases, o que causa a destruição das camadas lipídicas liberando o fármaco no interior da célula (TSCHAIKOWSKY & BRAIN, 1994).

A depender do tecido que os macrófagos estejam, a via de administração será um fator determinante. Injeções intraperitoneais são usadas para depletar macrófagos peritoneais, macrófagos dos nódulos linfáticos e do baço. A via intravascular é utilizada para depletar macrófagos do fígado e baço. A administração intraventricular também é realizada para atingir macrófagos perivascularares, meninges e cerebelo (VAN ROOIJEN & HENDRIKX, 2010).

3 OBJETIVO

Objetivo Geral

- Avaliar o papel dos macrófagos na imunopatogenia da fibrose septal induzida por *Capillaria hepatica*.

Objetivos específicos:

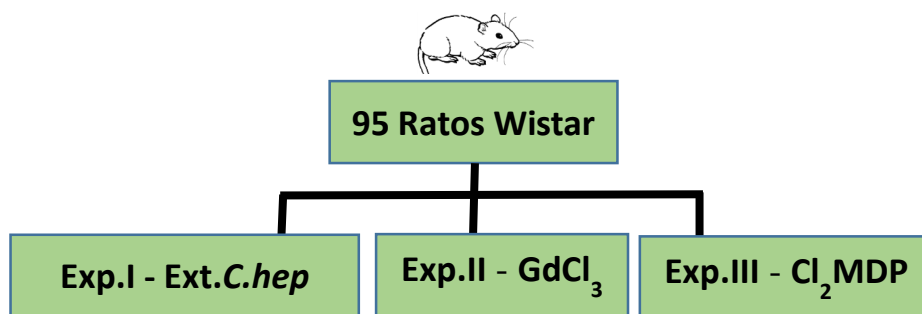
- Avaliar o papel dos macrófagos na patogenia da fibrose septal através da depleção destas células com Diclorometileno Difosfonato (Cl₂MDP) e Cloreto de Gadolínio (GdCl₃).
- Avaliar o efeito da depleção dos macrófagos na ativação de células estreladas/miofibroblastos utilizando a técnica de imuno-histoquímica
- Verificar o efeito *in vitro* dos extratos do ovo imaturo e dos vermes de *Capillaria hepatica* sobre macrófagos primários, através da análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.
- Avaliar se os extratos brutos derivados do ovo e do verme são capazes de induzir fibrose septal hepática.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 95 ratos Wistar de ambos os sexos. Os animais foram fornecidos pelo biotério de experimentação do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-Ba. Estes foram alocados em gaiolas, em ciclos dia e noite de 12 horas, em condições de temperatura e umidade ambientais, recebendo ração e água *ad libitum*. Os ratos foram separados randomicamente nos seguintes grupos:

4.1 Grupos Experimentais - *In vivo*

Os ratos foram separados randomicamente em três grupos: Experimento I, II e III.



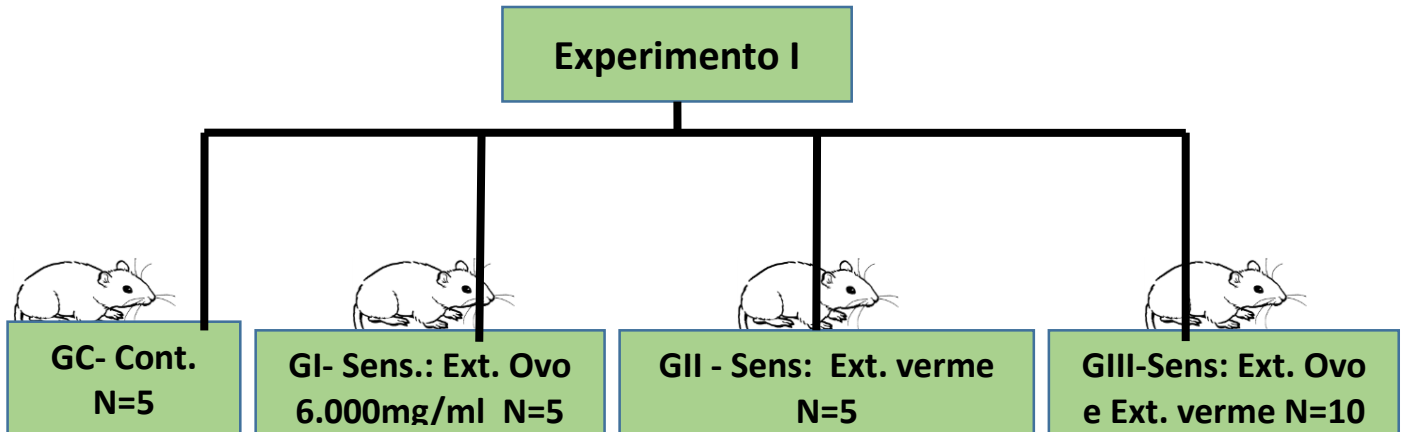
Experimento I - Sensibilização com Extrato de verme e de ovo de *Capillaria hepática*

GC- Cinco animais de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g foram inoculados através da veia da cauda com solução salina.

GI- Cinco ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram sensibilizados com extrato bruto de ovo (6.000mg/ml) de *Capillaria hepatica* por via intravenosa;

GII- Cinco ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram sensibilizados com extrato bruto de verme (3.800mg/ml) de *Capillaria hepatica* por via intravenosa.

GIII- Cinco ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram sensibilizados com extrato bruto de verme e ovo (3.800+6000mg/ml) de *Capillaria hepatica* por via intravenosa.



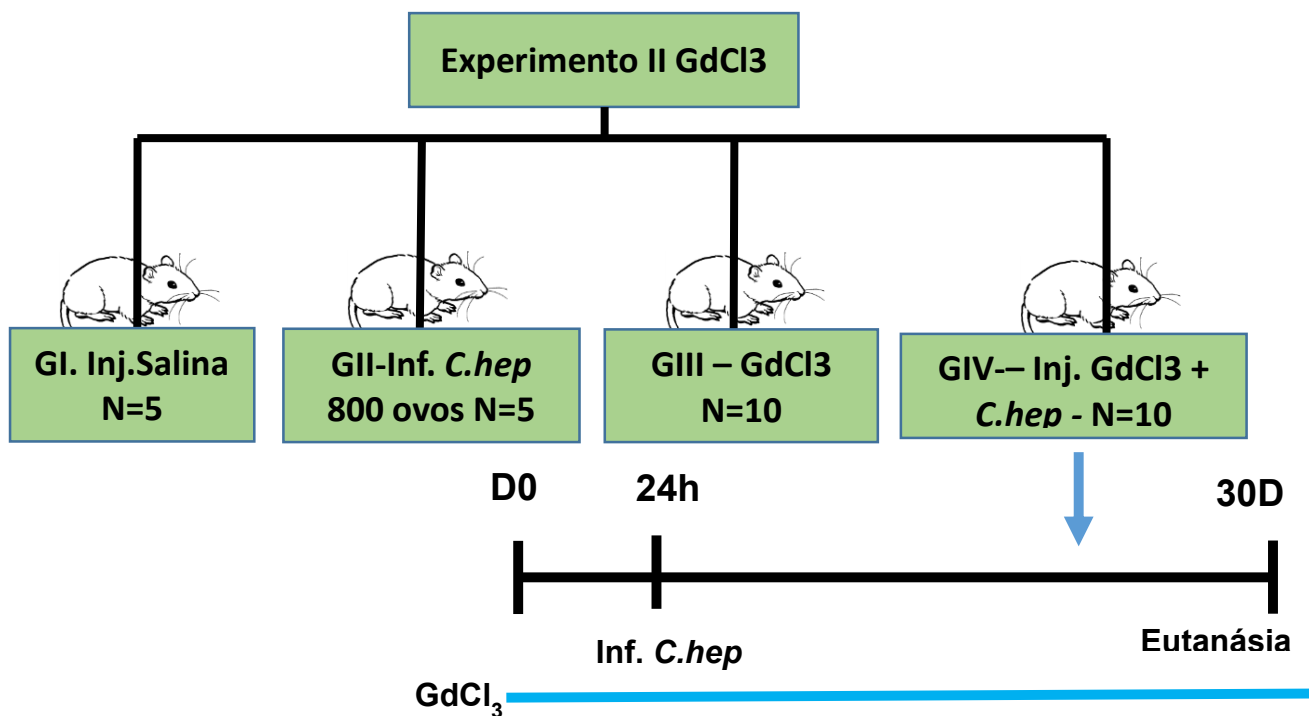
Experimento II - Cloreto de Gadolínio (GdCl₃)

GI- Cinco animais de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g foram inoculados através da veia da cauda com solução salina.

GII- Cinco ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram infectados com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* por via gástrica.

GIII- Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram tratados pelo método intravenoso com cloreto de gadolínio (GdCl₃)10mg/kg Gadolinium(III) Chloride hexahydrate - Sigma- Aldrich (HARDONK et al., 1992).

GIV - Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram tratados pelo método intravenoso com cloreto de gadolínio e infectados com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* por via gástrica.



Experimento III - Diclorometileno Difosfonato Cl₂MDP

GC- Cinco animais de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g foram inoculados através da veia da cauda com solução salina.

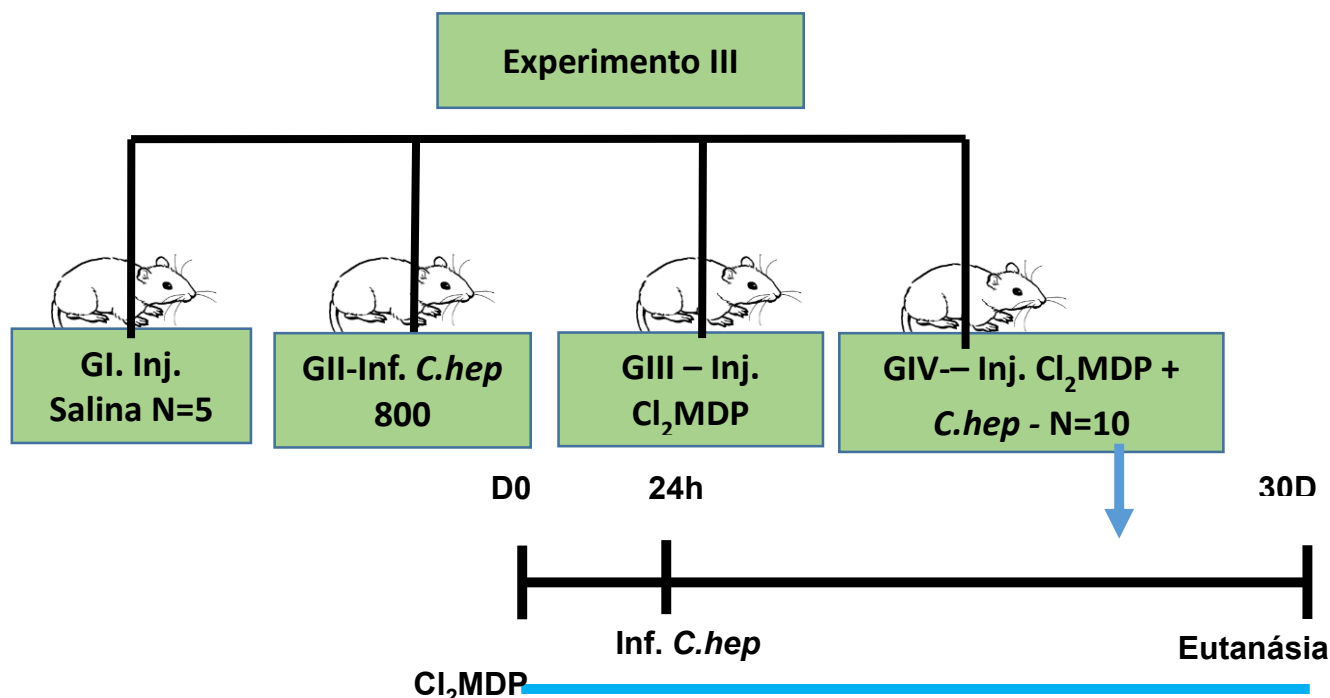
GI- Cinco ratos Wistar de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram infectados com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* por via gástrica.

GII- Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram tratados pelo método intravenoso com lipossomas contendo diclorometileno bifosfonato (Cl₂MDP) 1 mg/mL (KURAHASHI et al., 2008, MEIJER et al., 2000).

GIII - Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram tratados pelo método intravenoso com lipossomas contendo diclorometileno bifosfonato (Cl₂MDP) 1 mg/mL e infectados com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* por via gástrica.

GIV- Dez ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g, foram tratados pelo método intravenoso com lipossomas contendo salina e infectados com 800 ovos embrionados de *Capillaria hepatica* por via gástrica.

GV - Cinco ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 200 a 250g foram tratados com lipossomas contendo salina.



Elaboração dos lipossomas

As vesículas lipídicas (lipossomas) foram preparadas seguindo o modelo clássico de hidratação do filme lipídico (Van Rooijer & Sanders 1994). Uma solução contendo fosfatidilcolina (86,4mg) e colesterol (8,0mg) foi preparada. A esta, foi adicionado 18mL de clorofórmio e 2 mL de metanol. Seguida a evaporação desta solução formou-se o filme lipídico. A hidratação deste último foi efetuada com a solução tampão contendo o fármaco Diclorometileno Difosfonato (Cl₂MDP), sob agitação magnética vigorosa, promovendo a formação e dispersão de lipossomas multilamelares. Este foi levado ao agitador tipo vórtex, por 10 minutos e submetido a sonicação em processador ultrassônico, o que resultou em uma preparação semitransparente contendo

vesículas pequenas de tamanho uniforme. Lipossomas controles foram hidratados somente com a solução tampão.

4.2 Eutanásia e Coleta de soro

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ no 30º dia pós-infecção ou sensibilização, quando houve coleta do fígado e soro. Os fragmentos de fígado foram encaminhados para o setor de histotecnologia para realização de colorações de rotina.

4.3 Histopatologia:

Fragmentos de fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais foram fixados em formol Millonig (pH 7.4). As secções foram incluídas em parafina e coradas com Hematoxilina/Eosina (H&E) e picrosírius-vermelho para quantificação de colágeno.

4.4 Imuno-histoquímica:

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 4µm de espessura e montados sobre lâminas previamente silanizadas. Após desparafinização e reidratação, os cortes foram tratados por 30 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% (DAKO) e com o ProteinBlock (Dako) por 30 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos: anti-αSMA (marcador de miofibroblastos) e anti-CD68 (marcador de monócitos/macrófagos). Quando necessário, realizou-se a recuperação antigênica em microondas por 10 minutos. Foi utilizado o sistema EnVision™ Dual Link (Dako) para visualização e as lâminas foram posteriormente contracoradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas com bálsamo do Canadá.

Tabela 1– Anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica.

Proteína	Anticorpo	Tratamento	Diluição	Incubação
α SMA	Abcam 32575	Tampão Citrato 0.01M [#]	800	4°C 16hrs
CD68	Dako M0876	Tampão Citrato 0.01M [#]	250	4°C 16hrs

10 minutos em micro-ondas em ciclos de potência variada

4.5 Morfometria:

Os cortes corados com o picrossírius-vermelho e marcados para α -SMA e CD68 foram submetidos à análise morfométrica utilizando o programa Adobe Photoshop. O sistema de captura de imagem que utilizamos corresponde ao microscópio Olympus acoplado à câmera digital que estava conectada a um computador. Fotos de cinco áreas aleatórias de tamanho semelhante (aumento de 200x) de cada caso animal (n=5 por grupo) foram analisadas pelo programa que mensurava a quantidade de pixels presente no tecido corado/marcado.

4.6 Contagem de células

Para a quantificação da imunomarcagem para CD68, foram analisadas fotos de 10 áreas portais contendo veias porta de tamanho semelhante (ampliação de 100x). Os casos foram contados por três examinadores diferentes utilizando o contador de células do programa Image J (NIH).

4.7 Obtenção do ovo e verme de *Capillaria hepatica* e elaboração dos extratos proteicos.

O extrato proteico total do verme e do ovo de *Capillaria hepatica* foram preparados segundo o método de Carter e Colley (1978). Os vermes foram cuidadosamente coletados de animais com um mês de infecção e submetidos à lise direta através do tampão de específico. Após a homogeneização em pistilo de teflon, o extrato proteico foi centrifugado a 14.000 rpm por 40 minutos a 4°C e esterilizado pela utilização de filtros de 0,22 μ m. Os extratos proteicos de ovos

de *C. hepática* também foram obtidos de animais com um mês de infecção e imersos em tampão de lise, além disso estes foram submetidos a ultrasonicação por três períodos de um minuto e centrifugação semelhante ao antígeno de verme. A concentração de proteína foi determinada pela quantificação utilizando o espectrofotômetro NanoDrop. O sobrenadante foi alíquota e guardado a -70°C para posterior uso. A concentração final utilizada nos ensaios *in vitro* foi de 20µg de proteína/ml.

Quantificação de Endotoxinas

Durante a preparação dos extratos proteicos do verme ou ovo do *Capillaria hepática*, pode ocorrer contaminação por bactérias Gram negativas (LPS). Para verificar possíveis contaminações a quantidade de endotoxinas foi analisada utilizando o ensaio do lisado de amebócitos do *Limulus* (Lonza, QCL1000) de acordo com as recomendações do fabricante. Um grupo controle contendo a mesma quantidade de endotoxinas presente nos extratos proteicos de verme ou ovo foi adicionado em todos os experimentos *in vitro*.

4.8 Aquisição de macrófagos primários

Para investigar o efeito dos extratos solúveis do ovo e do verme de *Capillaria hepatica* em macrófagos, utilizamos macrófagos primários de rato.

Sendo assim, ratos Wistar de ambos os sexos tiveram sua cavidade peritoneal lavada com solução salina (50ml) contendo heparina. O líquido gerado foi aspirado e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sedimento celular foi ressuspenso em Dullbecco's modified Eagle's medium (DMEM), contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) 10000U dos antibióticos penicilina e estreptomicina e contado em câmara de Neubauer. As células obtidas foram colocadas 2×10^6 células por poço em placas de cultura de seis poços, e alocadas

em estufa a 37°C, atmosfera de CO₂ durante 24 horas para aderência. Após isso, as células foram lavadas duas vezes com solução salina e mantidas em DMEM.

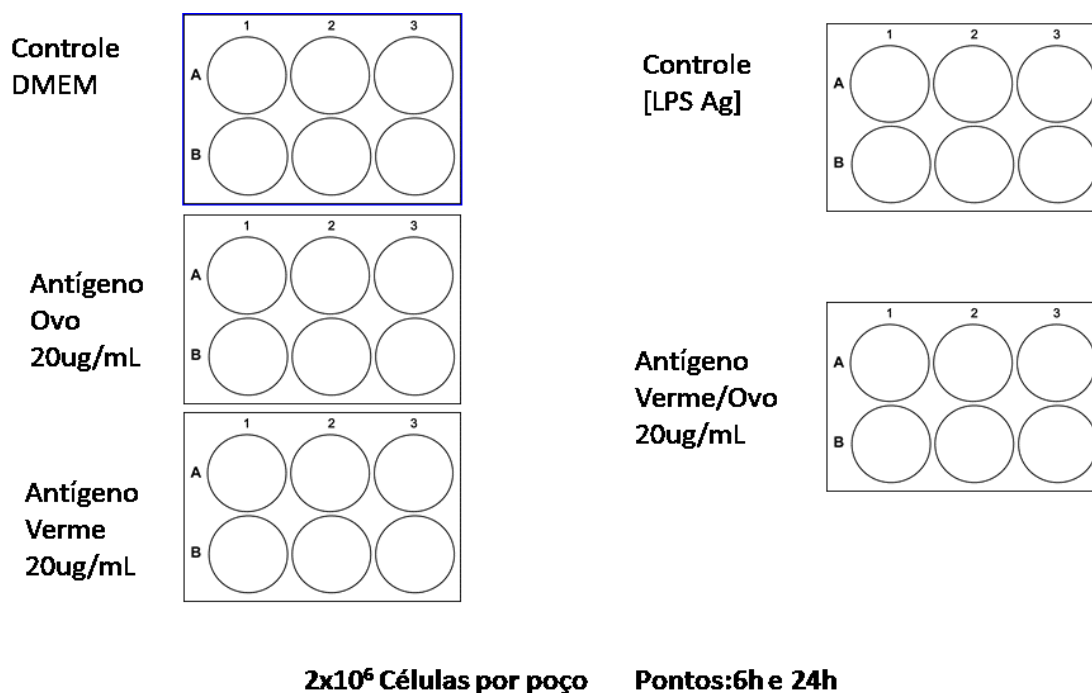


Figura 2- Desenho experimental do estudo *in vitro*. Estimulação de macrófagos primários com extratos proteicos de *C. hepatica*.

4.9 Experimento IV - *In vitro*

Estimulação de macrófagos primários com extrato proteico de *C. hepatica* (do ovo imaturo e verme adulto): Os macrófagos primários de rato foram incubados por cerca de 24 horas após terem sido semeados em placas de cultura. Em seguida essas células foram estimuladas com 20µg/mL do extrato proteico de *C. hepatica* (do ovo imaturo ou do verme adulto) ou o mesmo volume de PBS ou LPS por 6 e 24 horas. Após a sensibilização, o sobrenadante foi retirado e as células aderidas foram lisadas com tampão de lise diretamente na placa. O produto da lise foi transferido para um tubo de 1,5 mL. O RNA total foi extraído e submetido a análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real onde foram investigados marcadores de ativação alternativa de macrófagos.

4.11 Extração de RNA, transcrição reversa e análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real:

Para análise da expressão dos genes de interesse foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). O RNA total dos macrófagos, crescidos em placas de seis poços, foi extraído utilizando o RNeasy Mini kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O cDNA foi produzido a partir de 5 µg de RNA total. O cDNA gerado foi diluído 1:20 em água livre de nucleases e utilizado como molde para a reação. Após tratamento com Dnase I, 5µg de RNA foram transcritos reversamente para gerar DNA complementar (cDNA) utilizando o protocolo de hexâmeros randômicos do kit First Strand Super Script II (Invitrogen). O qRT-PCR foi realizado pela técnica de SYBR green, utilizando o SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em placas de 96 poços, seladas com adesivo óptico ao final da reação. O termociclador usado foi o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Os ensaios foram realizados em triplicata. A reação foi feita a partir de 10ng de cDNA e o controle utilizado para quantificação foi o gene constitutivo GAPDH que foi utilizado como controle endógeno. Os valores de baseline (valores iniciais em que há pequenas alterações na fluorescência) foram ajustados. O threshold foi ajustado à região associada ao crescimento exponencial do produto da PCR. Investigamos a expressão de marcadores de macrófagos alternativamente ativados (Arg-1). Os níveis de expressão dos genes de interesse foram demonstrados como razão sob os níveis correspondentes ao grupo controle. Essas análises foram feitas pelo método de quantificação relativa da expressão genica $\Delta\Delta C_t$, que permite quantificar diferenças no nível de um alvo específico entre as diferentes amostras. Os níveis de genes alvos foram normalizados pelos níveis do controle endógeno.

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real (SYBR green) para rato.

Gene	Direção	Sequência dos primers 5'-3'
Arg1	Senso	GTGAAGAACCCACGGTCTGT
	Anti-senso	GCACCACACTGATTGTTCCA
TNF- α	Senso	ATGTGGAAGTGGCAGAGGAG
	Anti-senso	CGAGCAGGAATGAGAAGAGG
GAPDH	Senso	CACCCTGTTGCTGTAGCGTATTC
	Anti-senso	CGACTTCAACAGCAACTCCACTC

Primers da empresa Applied Biosystems usados no estudo da expressão gênica.

4.10 Análise estatística:

As análises e os gráficos foram feitos utilizando o Prism 6 Graph Pad versão 5.03 para Windows. Tendo em vista que todos os dados seguiram a distribuição normal utilizamos o teste T de Student para comparação das médias entre as variáveis. Considerando significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

4.11 Considerações Éticas

O projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ), sob o número 009/2012.

5. RESULTADOS

Sensibilização com extratos de verme e de ovo de *Capillaria hepatica*

Para analisar se os extratos do verme e do ovo eram capazes de induzir fibrose septal, sensibilizamos os animais e avaliamos a resposta hepática depois de 30 dias. Inicialmente avaliamos se o extrato do ovo sozinho era capaz de induzir fibrose septal. Para isso os animais foram sensibilizados intravenosamente com 6.000mg/ml do extrato do ovo. Após 30 dias, o fígado destes animais foram avaliados histologicamente e observamos poucas células inflamatórias no parênquima hepático, além da arquitetura hepática que continuava bem conservada, conforme exposto na **Figura 3A**.

Para avaliar se a sensibilização com extrato do ovo causava alteração na depósito de fibras colágenas, no fígado, empregamos a técnica de coloração com o corante picrossírius-vermelho. Esta avaliação demonstrou pouco ou nenhum depósito de fibras colágenas e conseqüentemente, ausência de fibrose (**Figura 4A**).

Em seguida avaliamos a capacidade do extrato bruto do verme em produzir fibrose septal. Para isso, os animais foram sensibilizados com 3.800mg/ml do extrato bruto do verme. Semelhante ao grupo anterior, o tecido hepático deste grupo não apresentou alterações estruturais; também não houve reação inflamatória nem proliferação celular. O endotélio hepático não apresentou alterações (**Figura3B**). Também não foi visualizado nenhuma depósito de fibras colágenas no parênquima destes animais (**Figura 4B**).

Ainda avaliando o papel dos extratos do ovo e do verme, sensibilizamos um terceiro grupo de ratos com uma junção dos extratos do ovo e do verme de *C.hepatica*, e após trinta dias analisamos o tecido hepático oriundo destes animais. A análise deste grupo não revelou alterações morfológicas na região dos espaços-porta nem na região da veia central (**Figura 3C**). Além disso, análise histológica deste grupo demonstrou que nem mesmo a junção dos

extratos ovo+verme de *C.hepatica* foi capaz de gerar fibrose septal, mudanças estruturais ou causar inflamação (**Figura 4C**).

Para verificar o efeito dos extratos de ovo e de verme sobre as células de Kupffer, foram realizadas imunomarcações para CD-68. A imunomarcação não demonstrou alterações histológicas ou quantitativas dos macrófagos presentes no parênquima hepático dos grupos sensibilizados com extratos do ovo ou do verme além dos índices basais. Nestes animais células positivas para CD-68 estavam presentes tanto na região portal como na região centrolobular, semelhante ao grupo controle (**Figura 5 A, B e D**). Os animais sensibilizados com extratos do ovo+verme também mantiveram os níveis basais de macrófagos (**Figura 5 C**).

Para verificar se administração dos extratos de ovo e de verme geraria a ativação de miofibroblastos, o tecido hepático deste grupo foi submetido à imunomarcação com α -actina de músculo liso (α -SMA). Os resultados desta análise não apresentaram ativação destas células nos animais sensibilizados com extrato de ovo nem nos animais sensibilizados com extrato de verme. Células actino positivas estavam presentes apenas nas paredes dos vasos (**Figura 6 A e B**). Nos animais sensibilizados com os extratos de ovo+verme um padrão semelhante de marcação foi observado, apresentando células actino positivas apenas em torno dos vasos (**Figura 6C**).

Depleção Macrofágica - Cloreto de Gadolínio - $GdCl_3$

Para avaliar a participação das células macrofágicas na fibrose induzida pela capilaríase, tentamos depletar os macrófagos com um fármaco bastante utilizado na literatura: o cloreto de gadolínio. Como esperávamos animais somente infectados com *C. hepatica* desenvolveram fibrose septal ao longo de todo parênquima hepático a partir da segunda semana de infecção. Nestes animais, a fibrose septal esteve acompanhada de intenso infiltrado inflamatório na região portal e no parênquima, além de depósito de fibras colágenas formando finos septos em todo tecido. Para avaliar alterações na citoarquitetura do tecido hepático nos diferentes grupos, utilizou-se a

coloração de rotina Hematoxilina e Eosina (H&E). A análise histológica do parênquima hepático demonstrou que após trinta dias todos os animais do grupo infectado pelo helminto *C. hepática* apresentava fibrose bem estabelecida. Também foi registrado a presença de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos típicos dessa fase da infecção (**Figura 7C**).

Um grupo adicional foi criado com animais tratados com 10mg de GdCl₃ duas vezes por semana durante um mês. Quando avaliado, este grupo apresentou arquitetura hepática preservada com hepatócitos íntegros (**Figura 7A**). Em um novo grupo, além do tratamento com cloreto de gadolínio, os animais foram submetidos a infecção com 800 ovos embrionados de *C. hepática* e após trinta dias, estes também foram avaliados quantitativamente em relação ao teor de colágeno. A análise histológica deste grupo revelou que a fibrose septal se desenvolveu normalmente com aumento na depósito de colágeno acompanhada de alterações no número de células parenquimatosas do infiltrado inflamatório (**Figura 7B**).

Para avaliar especificamente a depósito de fibras colágenas no parênquima hepático destes animais, usamos a coloração de picrossírius-vermelho a qual revelou que não houve depósito de colágeno além dos índices basais, no grupo composto por animais que receberam somente o tratamento com GdCl₃, e no grupo controle (**Figura 8 A e D**). Entretanto, nos animais não tratados e nos tratados com GdCl₃ e infectados, a fibrose septal se desenvolveu de forma semelhante (**Figura 8 B e C**).

Para avaliar a eficiência do tratamento com GdCl₃, os tecidos hepáticos dos animais submetidos a depleção macrofágica foram submetidos a imunomarcção com CD-68, o qual marca especificamente macrófagos. O tecido hepático dos animais tratados com GdCl₃ exibiram células CD-68 positivas espalhadas por todo parênquima hepático (**Figura 9 A**), semelhante ao grupo controle (**Figura 9 D**). No grupo tratado com GdCl₃ e infectado foi demonstrado células Cd-68 positivas no parênquima hepático e nos septos recém-formados (**Figura 9 B**), este mesmo padrão de marcação foi encontrado nos animais infectados não-tratados (**Figura 9 C**).

Depleção Macrofágica - Diclorometileno Difosfonato Cl₂MDP

Novos grupos terapêuticos foram elaborados para avaliar a depleção induzida pelo Diclorometileno Difosfonato (Cl₂MDP). A análise histológica do tecido hepático revelou que o grupo dos animais tratados com lipossomas encapsulados com Cl₂MDP não apresentou alterações morfológicas quando observados ao microscópio (**Figura 10 B**). Um segundo grupo de estudos contendo animais tratados com Cl₂MDP e infectados com *C. hepatica* foi analisado. A avaliação histológica deste grupo revelou uma diminuição da resposta inflamatória, além de uma alteração no depósito das fibras colágenas, exibindo uma distribuição reduzida das mesmas em todo tecido hepático (**Figura 10 D**). Os animais somente infectados com *C. hepatica* exibiram fibrose septal como esperado (**Figura 10 C**).

Para analisar de forma mais detalhada a depósito de colágeno nos grupos em questão, utilizamos a coloração baseada no corante picrossírius-vermelho, o qual marca especificamente as fibras colágenas. Neste contexto, o estudo do grupo controle evidenciou áreas restritas marcadas; estas regiões focais estavam relacionadas a áreas onde a depósito de fibras colágenas é comum, como nos espaços-porta e na parede de vasos (**Figura 11A**). O grupo tratado com Cl₂MDP apresentou o mesmo padrão de marcação do grupo controle (**Figura 11B**). O grupo infectado com *C. hepatica* apresentou septos fibrosos em grande número disseminados por todo o parênquima (**Figura 11C**). Em relação aos animais tratados com Cl₂MDP e infectados, eles também desenvolveram fibrose septal, entretanto nestes animais houve uma importante diminuição na quantidade de colágeno em todo parênquima (**Figura 11D**).

Para verificar as alterações na depósito de colágeno no tecido hepático, as amostras foram submetidas à análise morfométrica. Esta análise revelou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da quantidade de colágeno depositada no tecido hepático de animais infectados e tratados com Cl₂MDP quando comparados com grupo infectado não tratado (**Figura 11 E**).

Para avaliar a participação das células estreladas transdiferenciadas (miofibroblastos) no processo de fibrogênese induzida por capilaríase, utilizou-se a imunomarcação para α -actina de músculo liso (α -SMA). Devido à presença de reação actino-positiva nos espaços-portais e no endotélio, os animais controle expressaram algumas regiões marcadas (**Figura 12 A**). No grupo de animais tratados com Cl₂MDP também observamos a presença de células positivas nos espaços-porta e na parede dos vasos (**Figura 12 B**). Nos animais infectados, a presença de células com perfil actino-positivo foi marcante tanto nos septos recém formados como no parênquima hepático; confirmando assim, a ativa participação destas células neste processo (**Figura 12 C**). Entretanto, a presença de células actino-positivas foi visivelmente reduzida no grupo de animais infectados que receberam tratamento com Cl₂MDP (**Figura 12 D**). A análise estatística do estudo morfométrico da marcação com α -SMA demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de células actino-positivas entre os grupos controle e tratado com Cl₂MDP (**Figura 12 E**). Entretanto, no grupo infectado com *C. hepatica* os animais submetidos ao tratamento exibiram uma redução significativa na área marcada ($p < 0,05$) (**Figura 12 E**).

Os grupos analisados foram submetidos à imunomarcação com CD68. Ao analisarmos o tecido hepático dos animais controles que foram submetidos a esta marcação, verificamos a expressão deste marcador em uma quantidade basal de células. (**Figura 13A**). Os animais tratados com Cl₂MDP exibiram quantidades ainda menores de células marcadas demonstrando a eficiência em promover a depleção dos macrófagos nos animais tratados (**Figura 13B**). Já os animais infectados com *C. hepatica* e não tratados aumentaram muito a expressão de CD68 no fígado, revelando a intensa atividade dos macrófagos durante a infecção pela *C. hepatica* (**Figura 13C**). Em animais infectados e tratados com Cl₂MDP houve uma redução na expressão deste marcador indicando uma menor participação destas células na formação da fibrose septal (**Figura 13D**). Quando estes dados foram submetidos à análise estatística, verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão deste marcador (CD68) nos animais tratados com

Cl₂MDP e não infectados quando comparados aos controles. Também houve redução na quantidade de células CD68 positivas nos animais infectados e tratados ($p < 0.005$) quando comparados com os animais somente infectados (**Figura13 E**).

Experimentos *in vitro*

Para avaliar o efeito dos extratos do ovo e do verme de *C. hepatica in vitro* macrófagos peritoneais primários foram desafiados com estes extratos. Os macrófagos primários de ratos sensibilizados com extrato de ovo, de verme ou de ambos foram submetidos à análise da expressão gênica de alguns genes relacionados com a ativação macrofágica (TNF- α e Arg1).

Para avaliar o perfil celular das células estimuladas, analisamos a expressão gênica de TNF- α em macrófagos primários sensibilizados com extrato de ovo, de verme ou de ambos. Esta análise demonstrou que após 6 horas de estimulação com os extratos de verme, de ovo ou de ovo+verme os níveis de expressão de TNF- α aumentaram consideravelmente. Contudo, após 24h de estimulação os níveis de expressão de TNF- α diminuíram bastante em todos grupos sensibilizados (**Figura14**).

A avaliação da expressão da arginase-1 no cultivo de macrófagos primários sensibilizados com extrato de ovo, de verme ou de ambos (ovo+verme) revelou que quando estas células foram estimuladas com extrato de ovo, estas apresentaram um aumento na expressão de mRNA da arginase-1 após seis horas de estimulação. Esses níveis aumentaram ainda mais após 24 horas de estimulação. A sensibilização com extrato do ovo+verme apresentou uma cinética semelhante nos índices de RNAm de arginase-1. Os macrófagos estimulados com extrato de verme apresentaram um pequeno aumento na expressão da arginase-1 quando avaliados após 24 horas, sendo assim os macrófagos estimulados somente com extrato de verme expressaram níveis bem menores de arginase-1 quando comparados aos macrófagos estimulados com ovo ou ovo+verme (**Figura15**).

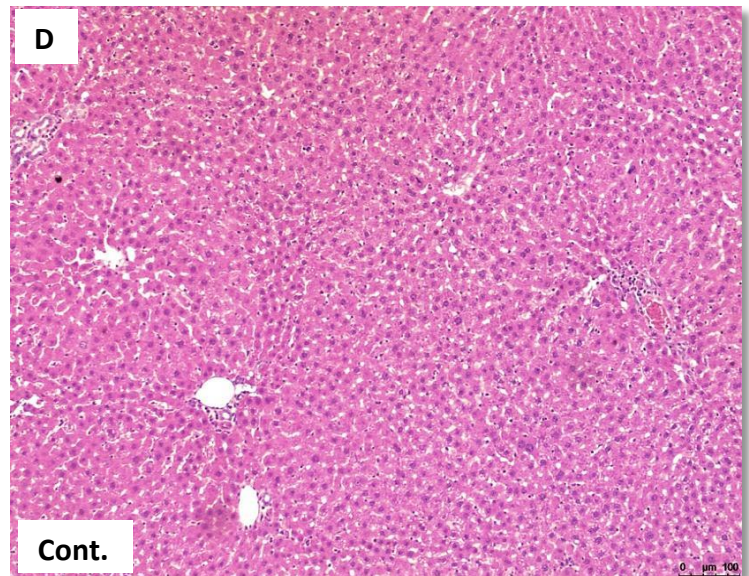
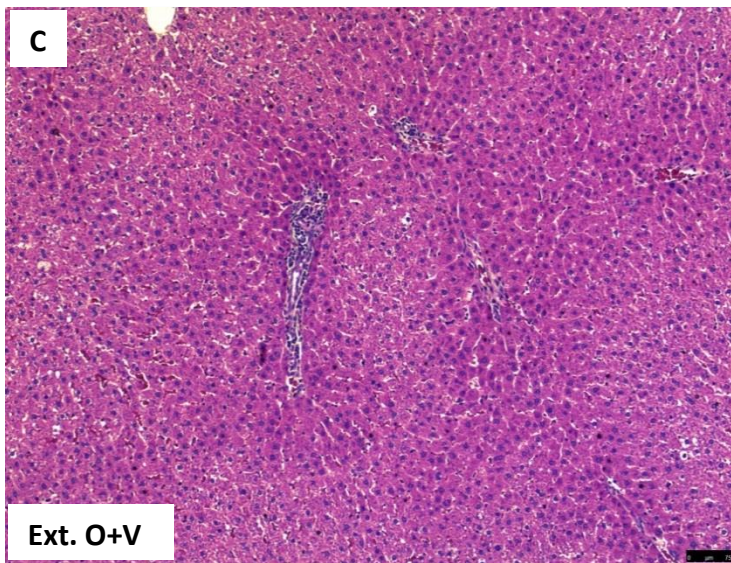
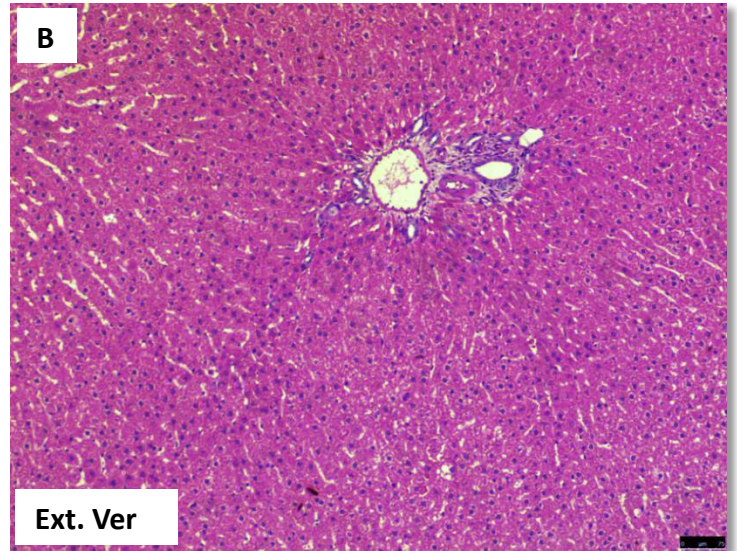
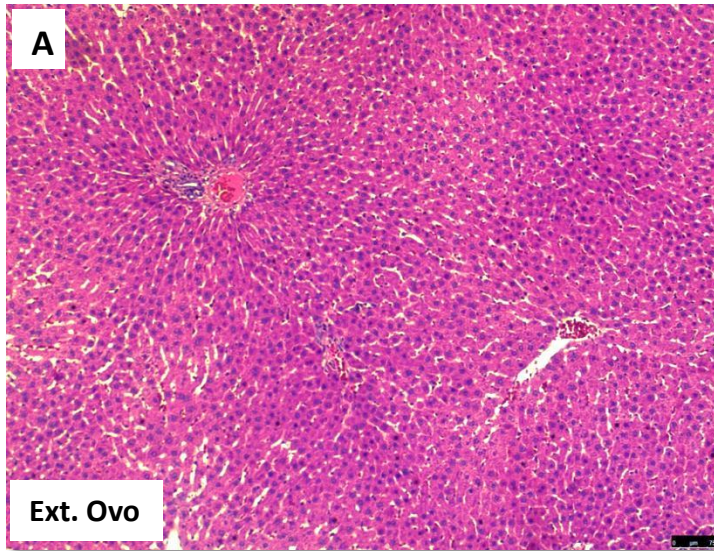


Figura 3. Sensibilização intravenosa de ratos com extrato de ovo, de verme e de ovo+verme de *Capillaria hepatica*. Tecido hepático corado com Hematoxilina e Eosina (H&E). A- Tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo (6.000mg/ml) B- Tecido de animal sensibilizado com extrato de verme (3.800mg/ml) C- Tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo e de verme D- Animal controle, tecido hepático preservado. Aumento de 100x.

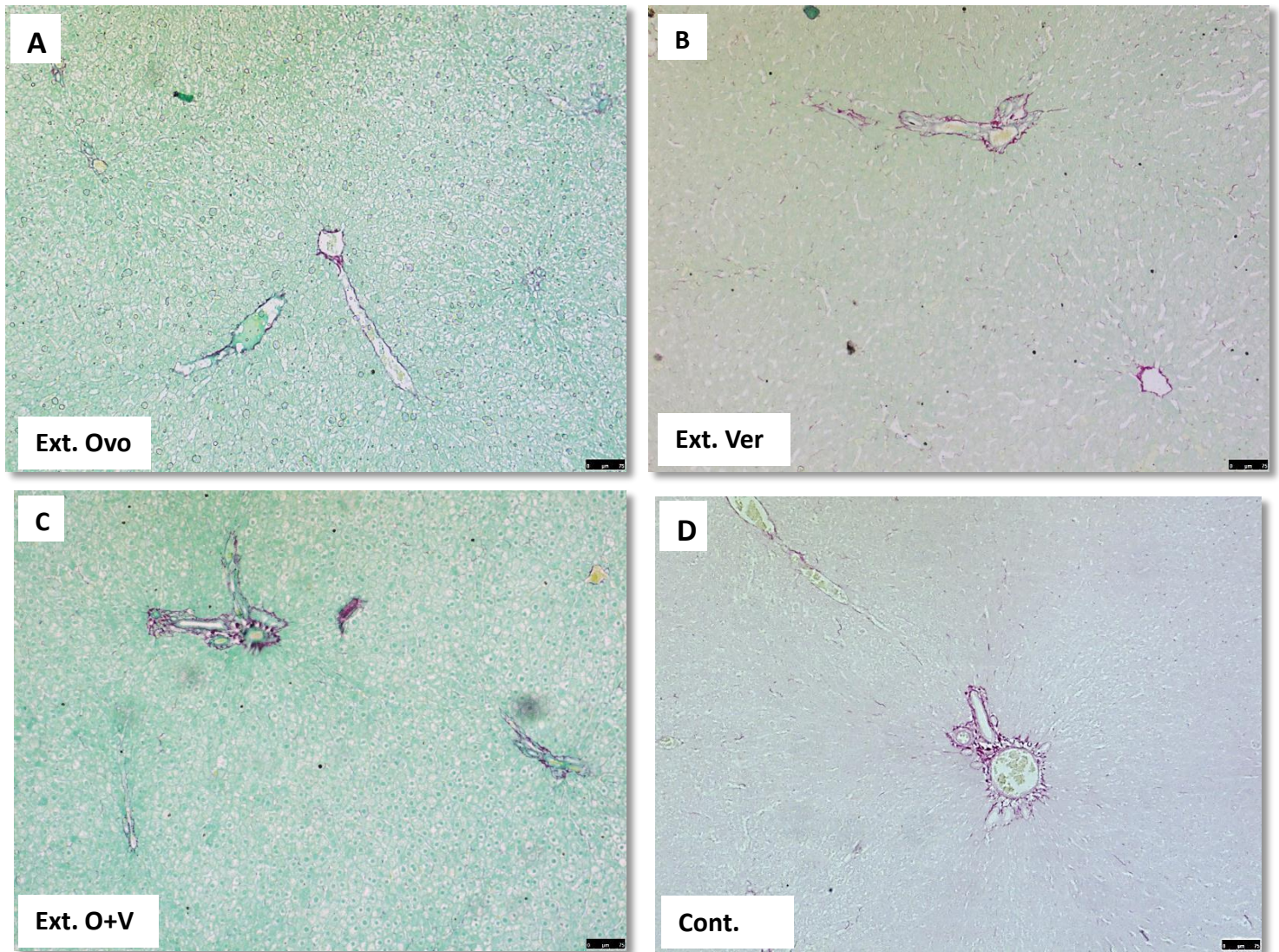


Figura 4. Sensibilização intravenosa de ratos com extrato de ovo, de verme e de ovo+verme de *Capillaria hepatica*. Tecido hepático corado com Picrossírius-vermelho. A- Tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo (6.000mg/ml) **B-** Tecido de animal sensibilizado com extrato de verme (3.800mg/ml) **C-** Tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo e de verme **D-** Tecido hepático de animal controle. Aumento 100x.

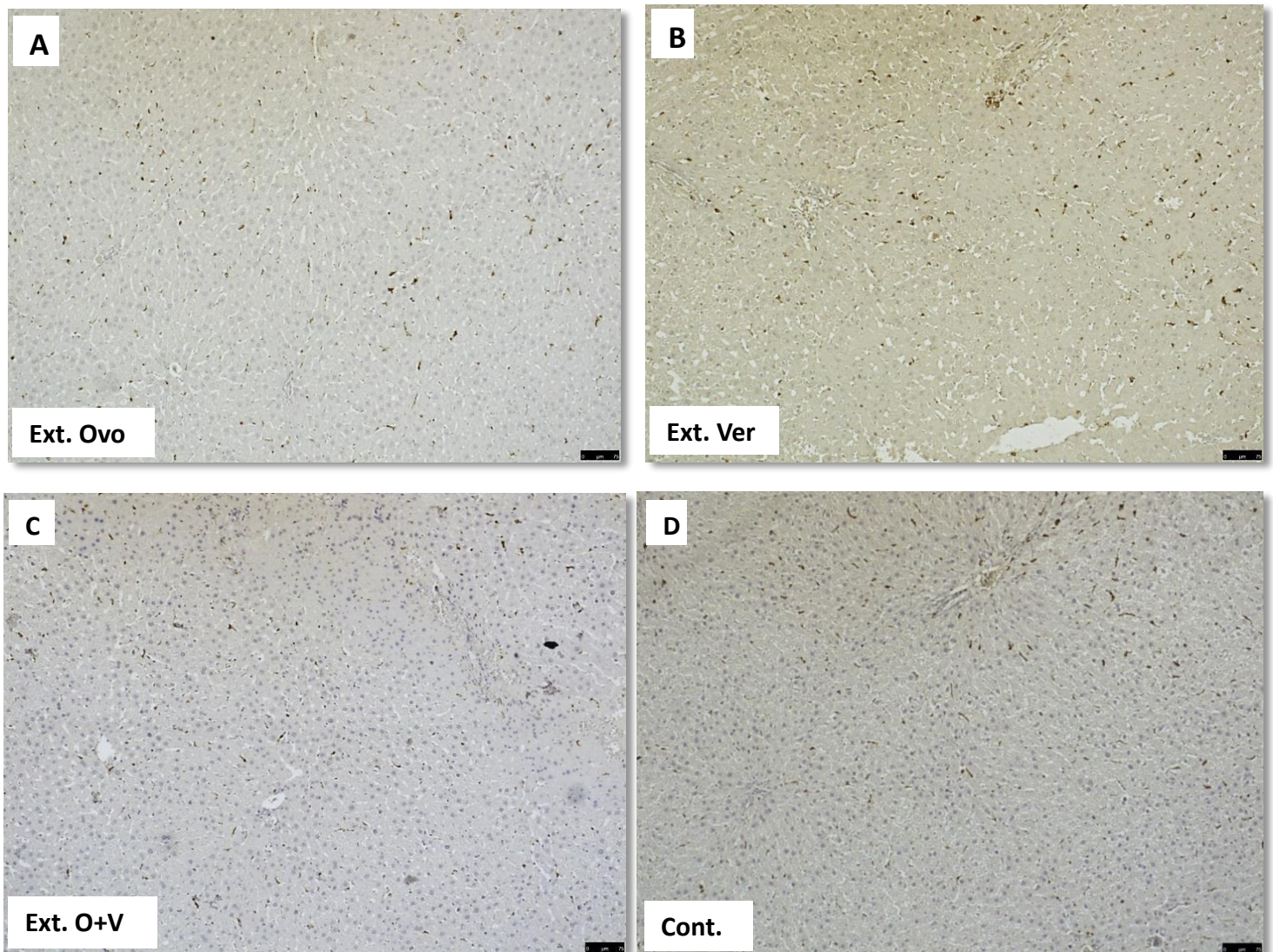


Figura 5. Fígado de ratos sensibilizados intravenosamente com extrato de ovo, de verme e de ovo+verme de *Capillaria hepatica*. Imunomarcção anti-CD68. A- Expressão de macrófagos marcados em tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo (6.000mg/ml) **B-** Expressão de macrófagos marcados em tecido de animal sensibilizado com extrato de verme (3.800mg/ml) **C-** Expressão de macrófagos marcados em tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo e de verme **D-** Expressão de macrófagos marcados em tecido hepático de animal normal. Aumento de 100x.

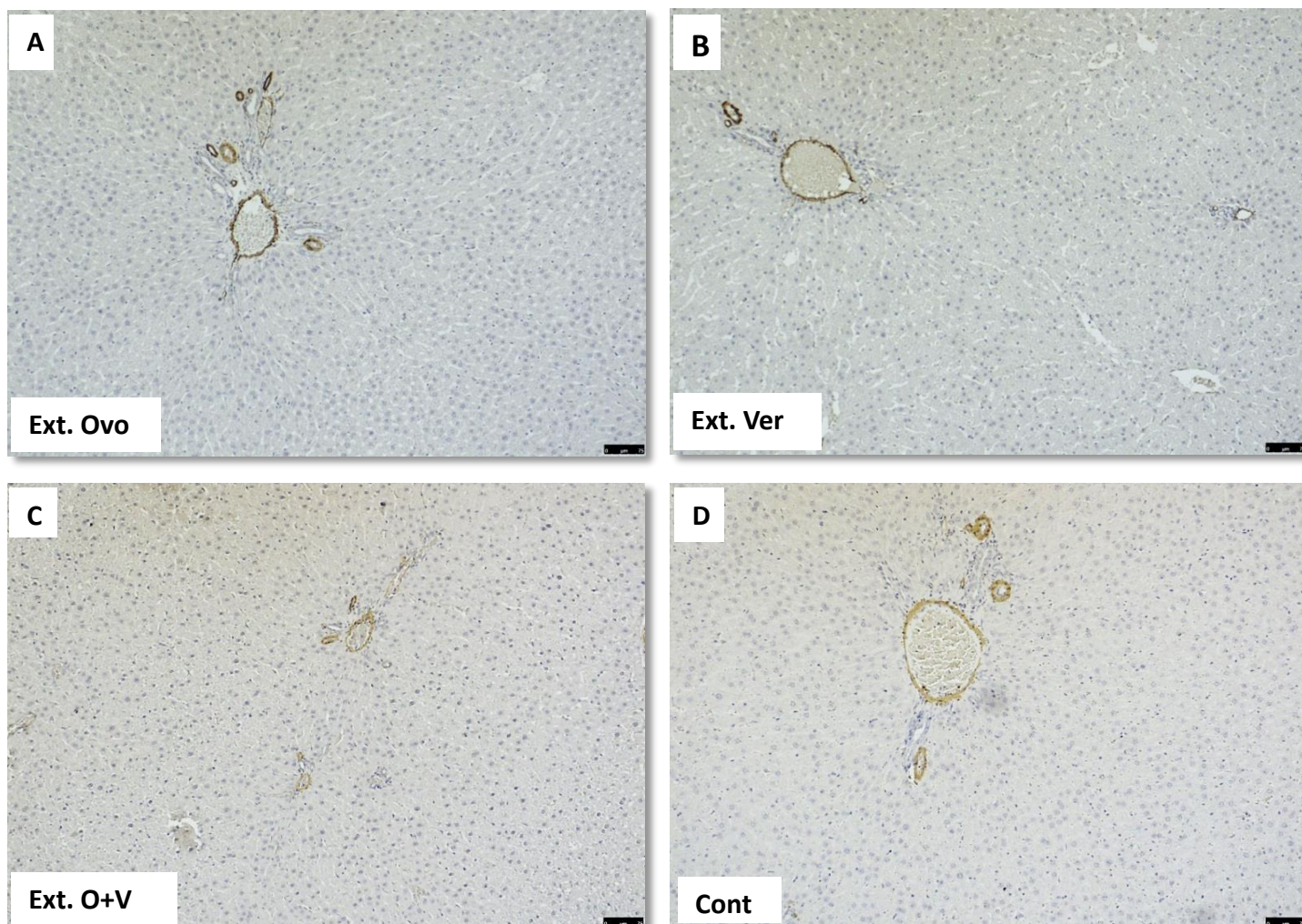
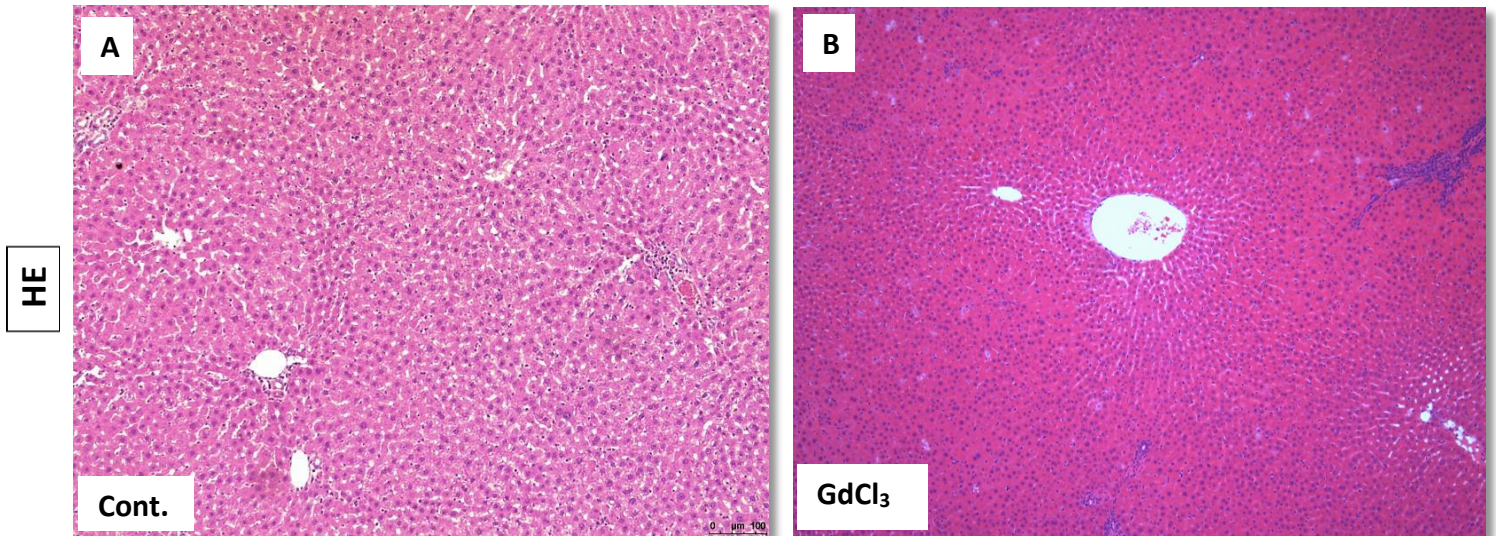


Figura 6. Fígado de ratos sensibilizados intravenosamente com extrato de ovo, de verme e de ovo+verme de *Capillaria hepatica*. Imunomarcção para anti- α -SMA. A- Expressão do marcador em tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo (6.000mg/ml) **B-** Expressão do marcador em tecido de animal sensibilizado com extrato de verme (3.800mg/ml) **C-** Expressão do marcador em tecido de animal sensibilizado com extrato de ovo e de verme **D-** Expressão do marcador em tecido hepático normal. Aumento de 100x.

Animais não infectados



Animais Infectados

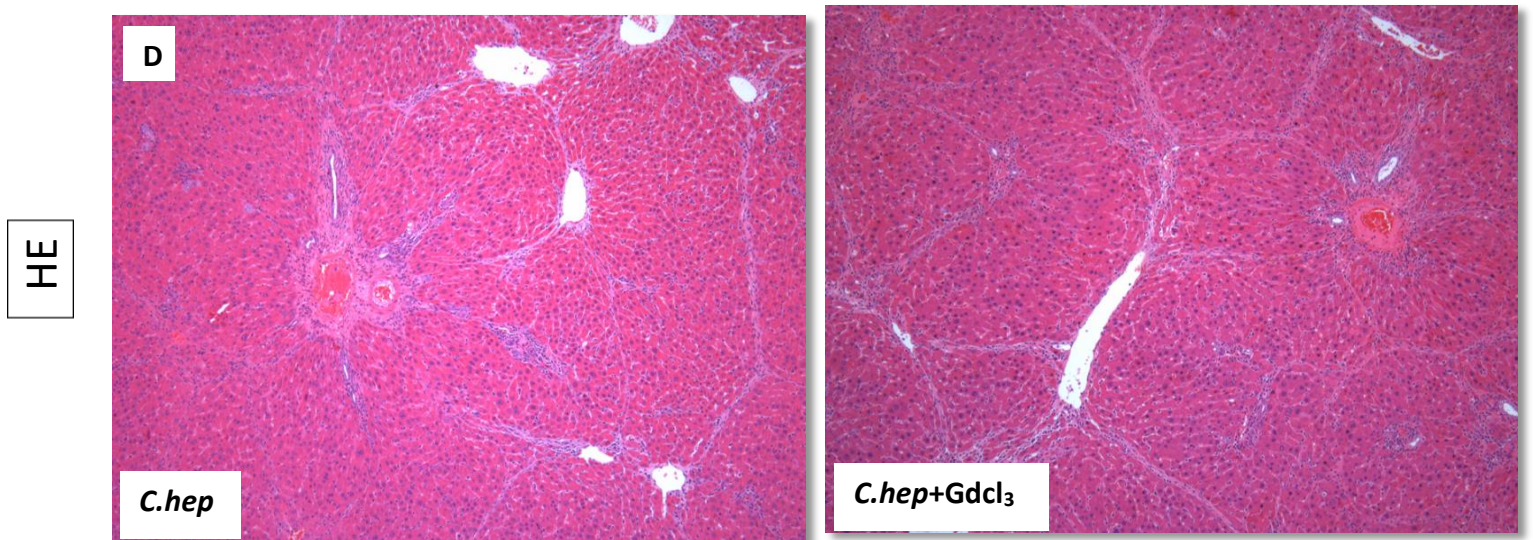
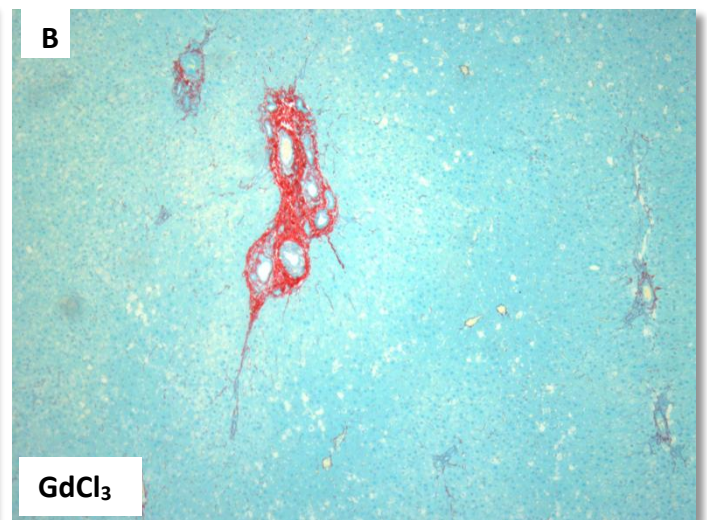
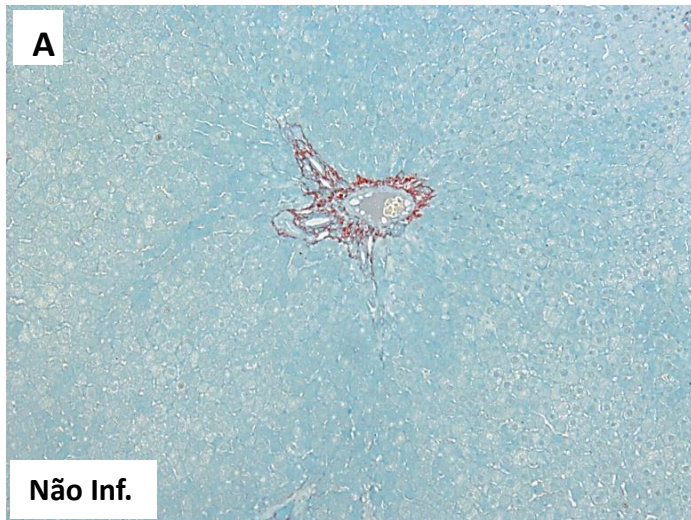


Figura 7. A- Fígado de ratos tratados intravenosamente com GdCl₃ (10mg/Kg) corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). A- Tecido hepático de animal controle B- Tecido hepático de animal tratado com GdCl₃ demonstrando arquitetura hepática preservada C- Tecido hepático de animal infectado com *C.hepatica* apresentando fibrose septal D- Fibrose septal em tecido hepático de animais infectados com *C. hepatica* e tratados com GdCl₃. D. Aumento de 100x.

Animais não infectados



Animais Infectados

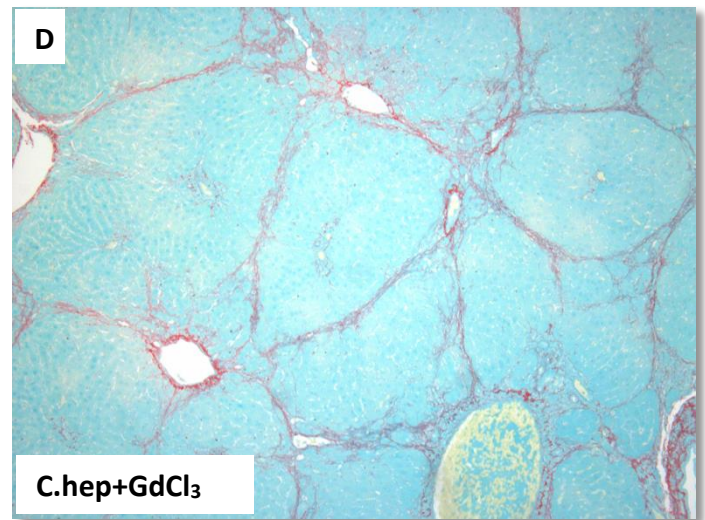
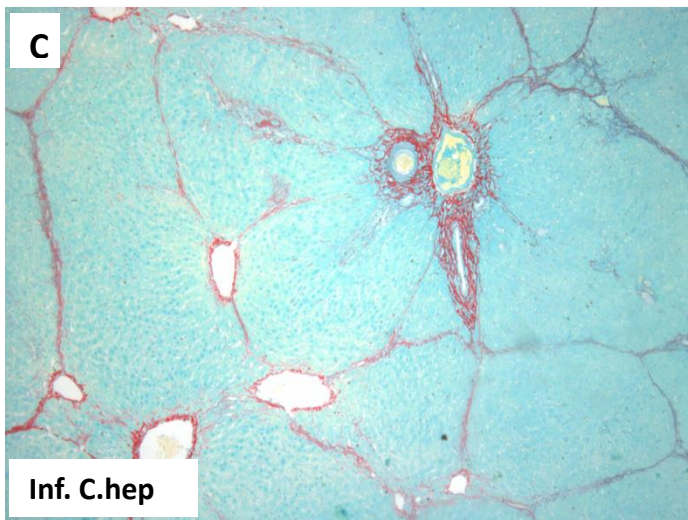
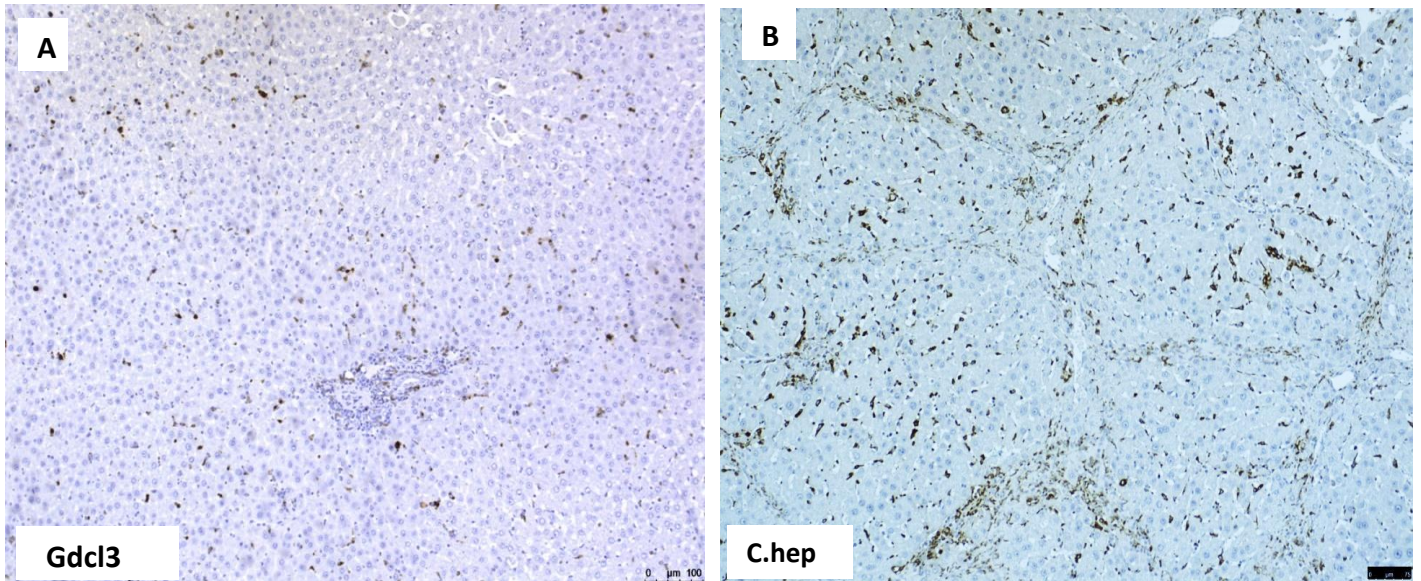


Figura 8. Fígado de ratos tratados intravenosamente com $GdCl_3$ (10mg/Kg) corados com Picrossírius-vermelho. A- Tecido hepático de animal controle **B-**Tecido hepático de animal normal tratado com $GdCl_3$ expressando fibras marcadas na região portal **C-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* apresentando fibras colágenas espalhadas por todo parênquima formando septos **D-** Tecido hepático de animal infectado com *C.hepatica* e tratado com $GdCl_3$, observa-se a fibrose septal disseminada pelo parênquima. Aumento de 100x

Animais não infectados



Animais infectados

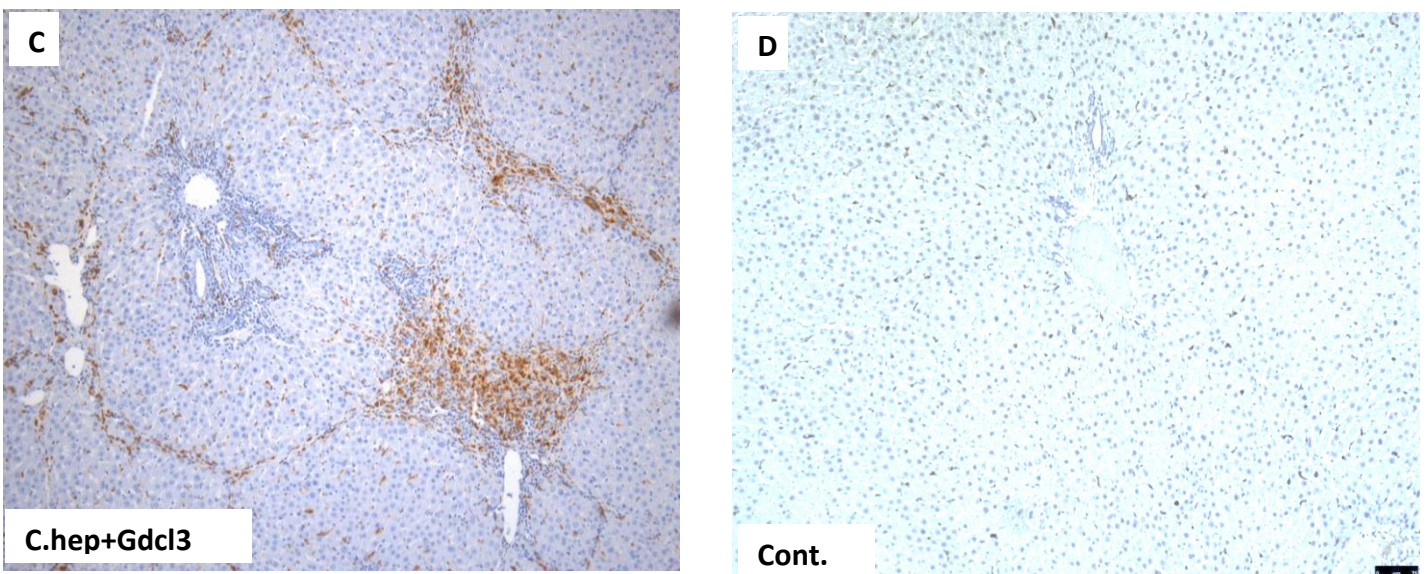
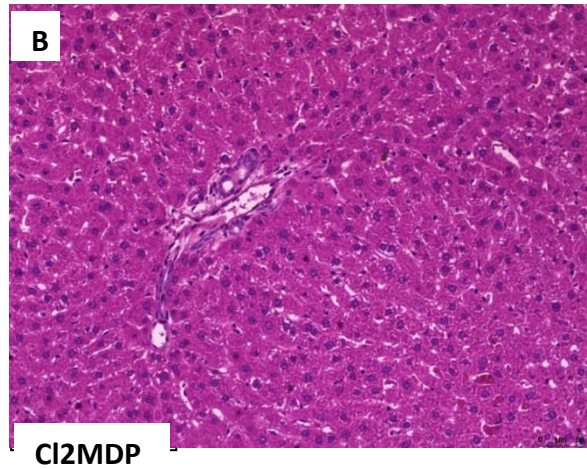


Figura 9. Fígado de ratos tratados intravenosamente com GdCl₃ (10mg/Kg) corados com CD-68. A-Tecido hepático de animal normal tratado com GdCl₃ apresentando células CD-68 positivas em todo parênquima hepático **B-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* e tratado com GdCl₃, observa-se a fibrose septal e células e macrófagos **C-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* exibindo fibrose septal e macrófagos disseminados no parênquima e nos septos **D-** Tecido hepático de animal controle. Aumento de 100x.

Animais não infectados

HE



Animais Infectados

HE

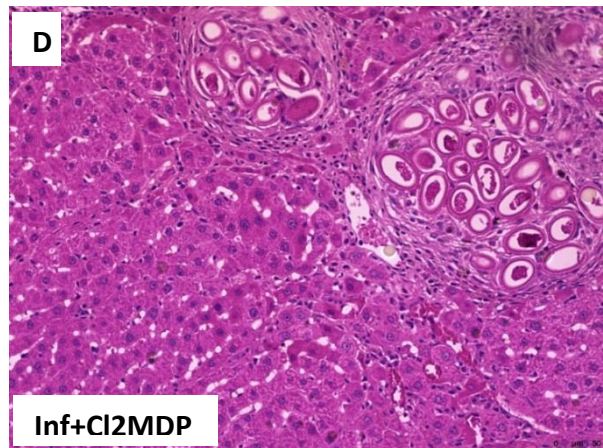
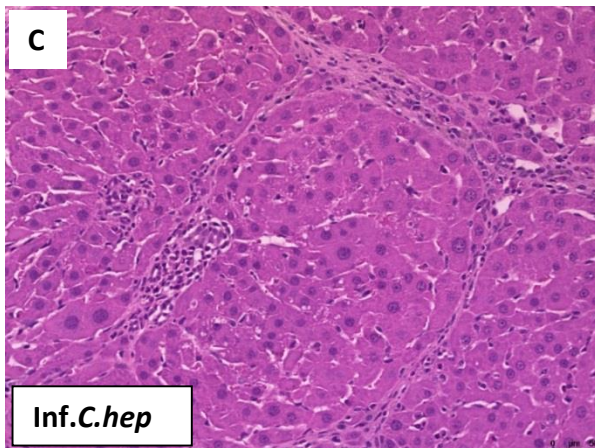
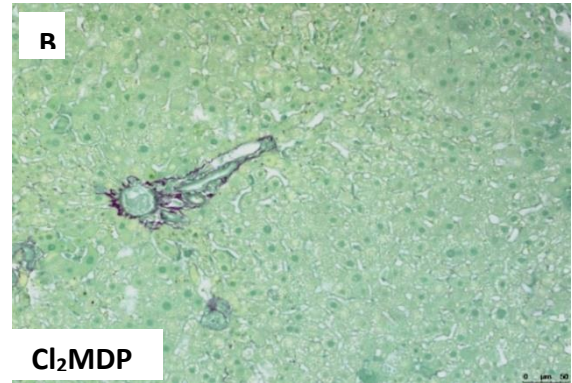
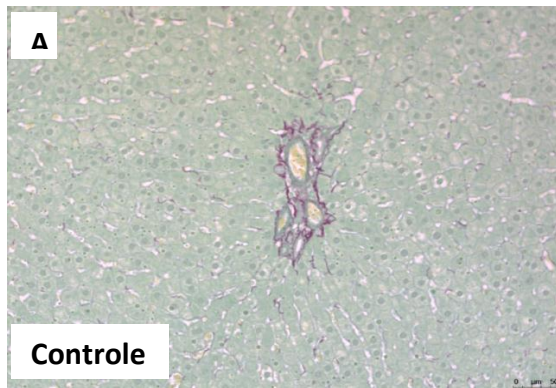


Figura 10. Fígado de ratos tratados intravenosamente com Diclorometileno Difosfonato (Cl₂MDP 1 mg/mL) corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). **A-** Tecido hepático de animal controle exibindo placas de hepatócitos dispostos radialmente **B-** Tecido hepático de animal tratado com Cl₂MDP com arquitetura hepática preservada **C-** Tecido hepático de animal infectado com de *C. hepatica*, apresentando septos fibrosos espalhados por todo o tecido **D-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* e tratado com Cl₂MDP, verifica-se uma diminuição clara do número de fibras espalhadas no parênquima. Aumento de 100x.

Animais não Infectados



Animais Infectados

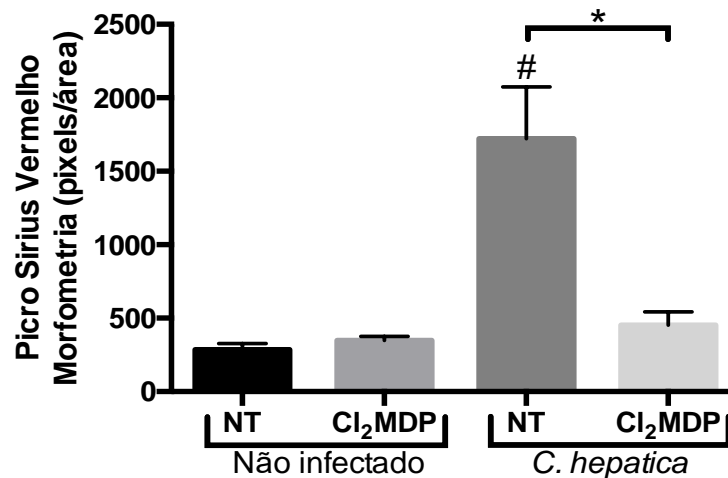
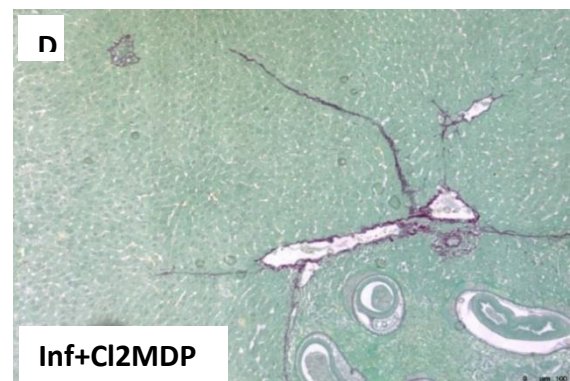
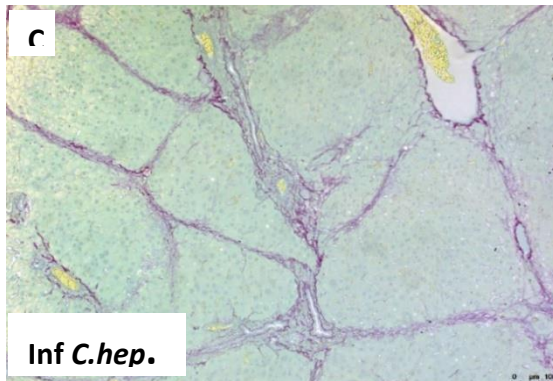
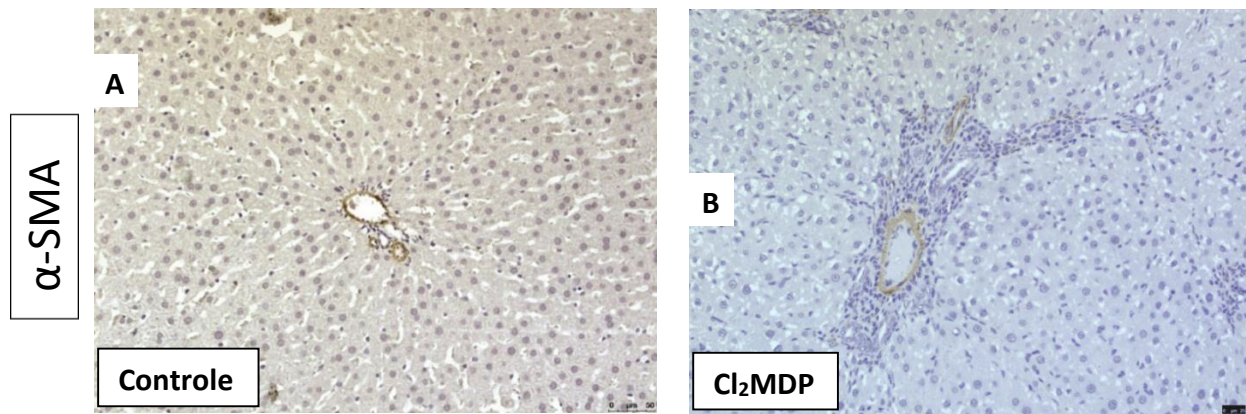


Figura 11. Fígados de ratos tratados intravenosamente com Cl₂MDP(1 mg/mL) e corados com Picrossírius-vermelho. A- Tecido hepático de animal controle exibindo fibras colágenas em torno de vasos. **B-** Tecido hepático de animal tratado com Cl₂MDP exibindo fibras colágenas semelhante ao padrão observado no animal controle **C-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* exibindo depósito de fibras colágenas em todo parênquima formando septos. **D** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* e tratado com Cl₂MDP exibindo fibras colágenas formando septos incompletos. Aumento de 100x. **E-** Quantificação das fibras colágenas através da coloração do Picrossírius-vermelho. Médias e erros padrão estão representadas *p<0.05 #p<0.05 vs respectivo controle.

Animais não infectados



Animais Inf. *C.hep.*

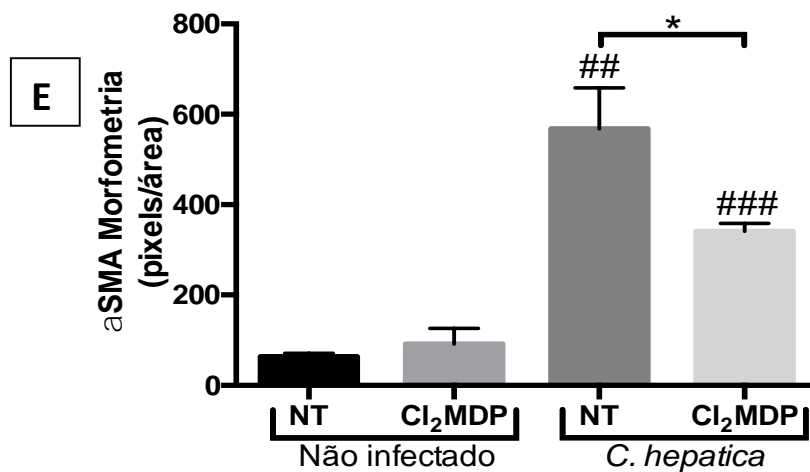
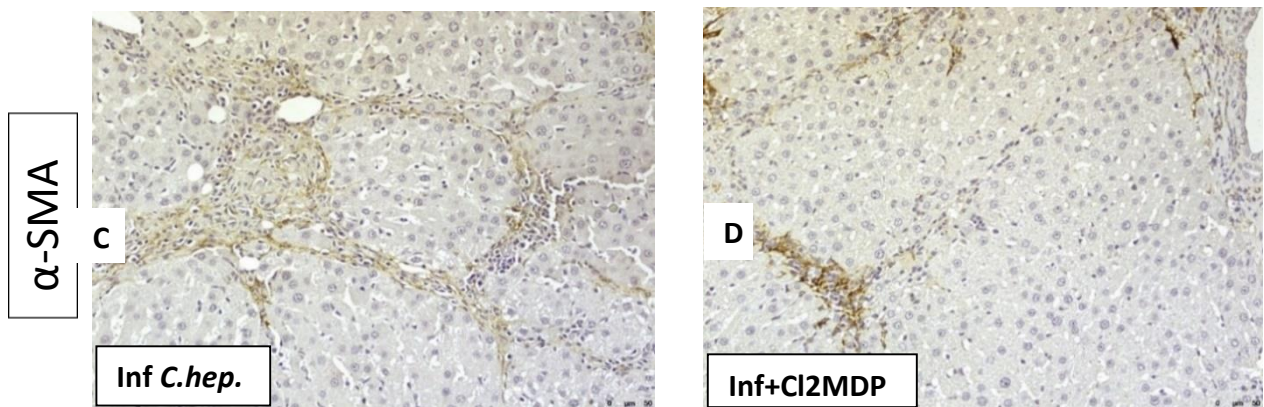
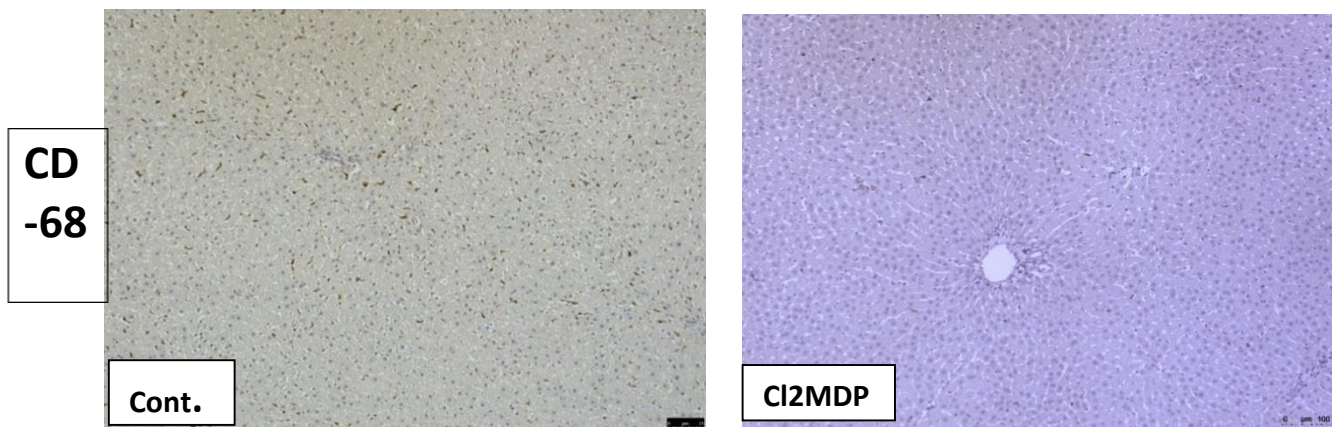


Figura 12. Fígado de ratos tratados intravenosamente com Cl₂MDP (1 mg/mL) Imunomarcção para anti-α-SMA- A- Tecido hepático de animal controle com poucas células actino-positivas, **B-** Tecido hepático de animal tratado com Cl₂MDP demonstrando a presença de células actino-positivas na região portal **C-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* apresentando células positivas em todo septo e na região portal **D-** Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* e tratado com Cl₂MDP, apresentando células positivas em regiões pontuais do septo. Aumento de 100x. **E-** Quantificação da imuno-histoquímica para α-SMA. Médias e erro padrão estão representadas *p<0.05, # p<0.05 vs respectivo controle ##p<0.01 vs respectivo controle, ###p<0.005 vs respectivo controle.

Animais não infectados



Animais infectados

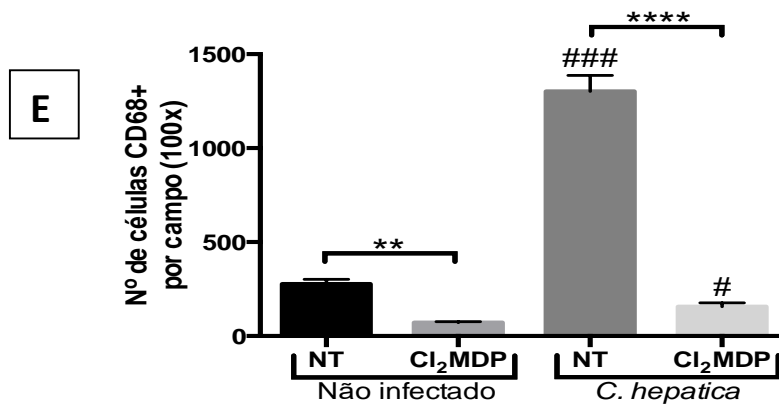
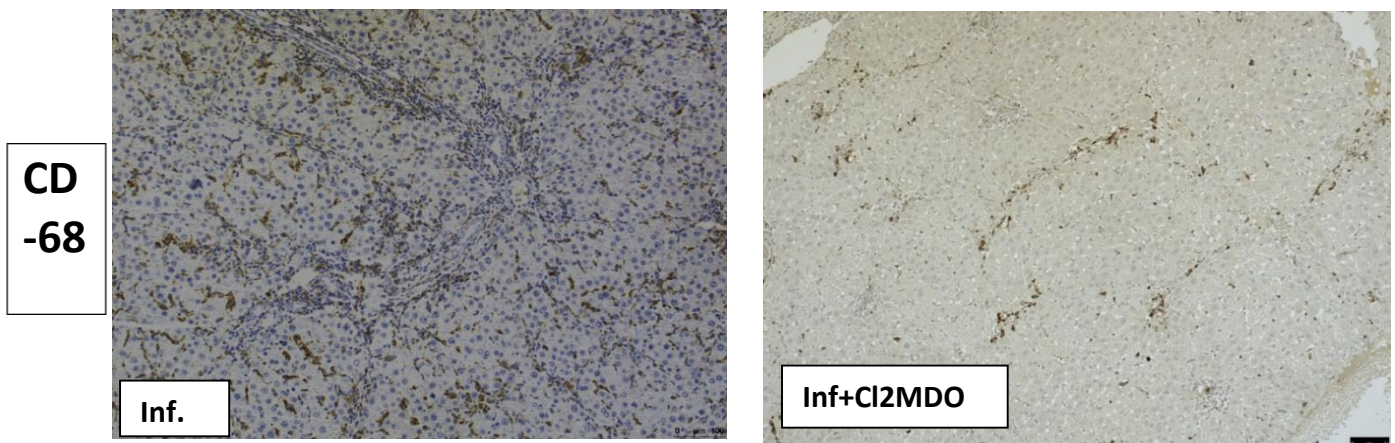


Figura 13. Fígado de ratos tratados intravenosamente com Cl₂MDP(1 mg/mL) Imunomarcção para anti- α -CD68 A- Tecido hepático de animal controle apresentando poucos macrófagos B- Tecido hepático de animal tratado com Cl₂MDP, observa-se uma redução marcante na quantidade de macrófagos marcados C- Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica*, nota-se macrófagos marcados presentes nos septos e no parênquima hepático D- Tecido hepático de animal infectado com *C. hepatica* e tratado com Cl₂MDP apresentando macrófagos distribuídos focalmente. Aumento de 100x. E - Quantificação da imuno-histoquímica para CD-68. Diminuição da

quantidade de macrófagos em relação ao grupo controle em animais não infectados. Animais tratados CI2MDP e infectados com *C. hepatica* apresentou redução significativa na quantidade de macrófagos. Médias e erro padrão estão representadas. * $p < 0.05$ # $p < 0.05$ vs respectivo controle.

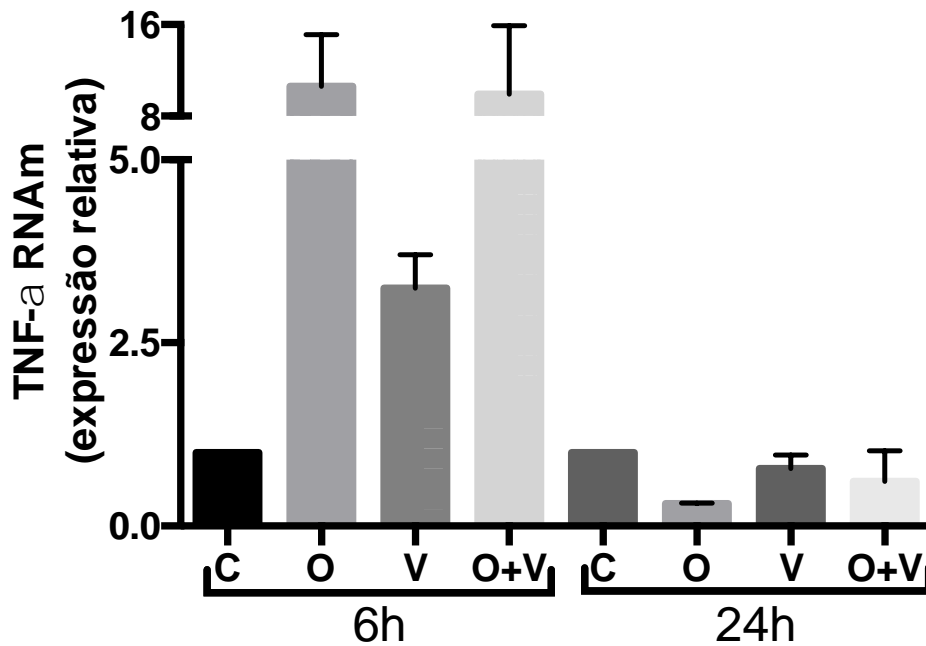


Figura 14. Quantificação relativa da expressão gênica (mRNA) de TNF- α por Real Time PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos primários peritoneais de rato (2×10^6 células) estimulados com extrato de verme e ovo ($20 \mu\text{g/mL}$) por 6 e 24 horas. O mRNA de GAPDH foi utilizado como normalizador. O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes.

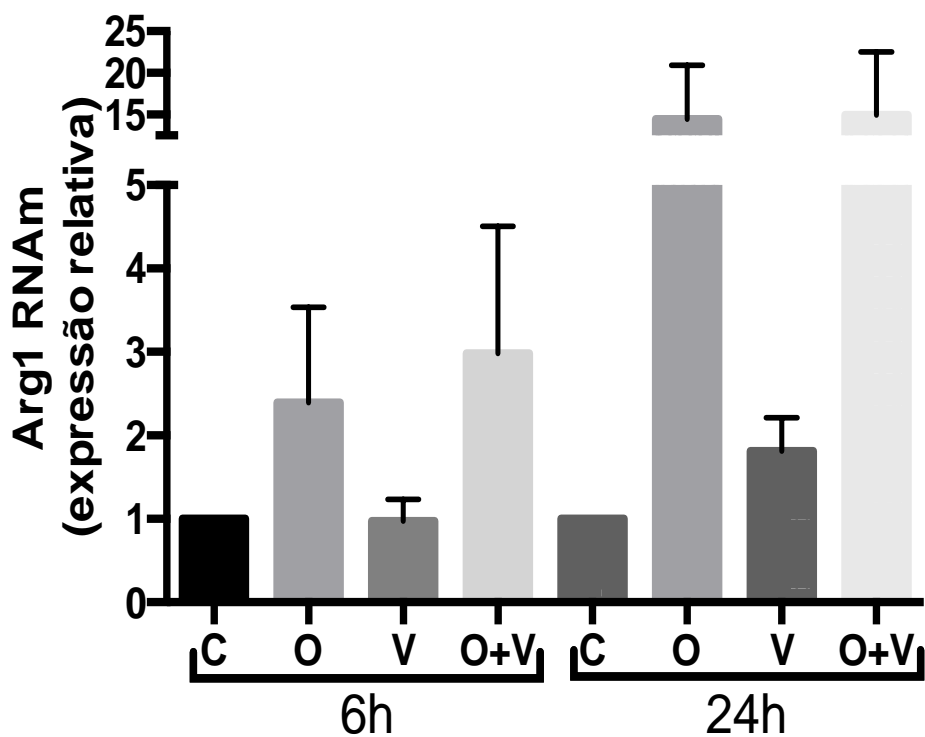


Figura 15. Quantificação relativa da expressão gênica (mRNA) de Arginase-1 por Real Time PCR utilizando o RNA total extraído de macrófagos primários peritoneais de rato (2×10^6 células) estimulados com extrato de verme, ovo e ovo+verme ($20 \mu\text{g/mL}$) por 6 e 24 horas. O gráfico representa a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes. O mRNA de GAPDH foi utilizado como normalizador.

DISCUSSÃO

A fibrose hepática é uma manifestação frequente em diversas doenças crônicas do fígado tais como: Hepatite septal crônica (GERBER & VERNACE, 1974), Cirrose septal incompleta (SCIOT *et al.*, 1988) e Esquistossomose (CHEEVER & ANDRADE, 1970). Sendo assim, vários modelos experimentais vem sendo utilizados para estudar os mecanismos deste processo (BATALLER & BRENNER, 2005; ELSHARKAWY *et al.*, 2017).

Os resultados que serão discutidos em seguida, referem-se a um estudo experimental que utilizou a infecção de ratos Wistar, com o helminto *C. hepatica*, como modelo de indução de fibrose septal e também para investigar a participação dos macrófagos e das células estreladas neste processo.

Neste estudo, experimentos *in vivo* e *in vitro* foram realizados para avaliar o comportamento de células macrofágicas. Os estudos *in vivo* avaliaram a resposta destas células frente a infecção de ratos com ovos embrionados de *C. hepatica*. Já os estudos *in vitro* avaliaram a resposta de macrófagos peritoneais primários, extraídos de ratos, após a sua sensibilização com extratos do ovo e do verme, e de ambos.

A infecção natural por *C. hepatica* estimula a proliferação e a ativação de células estreladas, de células de Kupffer, de células endoteliais, de fibroblastos e de outras células que compõe o tecido hepático (SOUZA *et al.*, 2006; ASSIS *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2001; IONICĂ *et al.*, 2016). O estudo histológico aqui realizado indicou que a resposta induzida pela capilaríase do rato parece estar relacionada a uma resposta imune mediada por células que se acentua com a produção dos ovos.

Além de infecções parasitárias, outros agentes como por exemplo o LPS é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação das células de Kupffer. Estudos que avaliaram as células de Kupffer isoladas de animais tratados com etanol, verificaram que tais células são importantes produtoras de citocinas durante a lesão hepática em diversos modelos

(YAMASHINA et al., 2000). As células estreladas são consideradas pericitos hepáticos pois ficam anexas ao espaço de Disse e podem ser ativadas por estímulos oriundos da corrente sanguínea (FRIEDMAN, 2008). Estas células, além de serem as principais produtoras de matriz extracelular parecem participar da resposta imune hepática, pois em um recente estudo *in vitro*, que avaliou a expressão de receptores de membrana envolvidos com a apresentação de antígenos, ficou demonstrado que células estreladas hepáticas humanas estimuladas com citocinas pró- inflamatórias expressavam HLA I, HLA II e CS40 (VIÑAS et al., 2003). Estes achados corroboram com os nossos resultados que confirmam a importância das células estreladas ativadas (miofibroblastos) na fibrogênese hepática, inclusive na fibrose septal, como demonstramos através da expressão de células actino-positivas observadas nos septos fibrosos em formação no modelo em questão.

Além da infecção pelo helminto *Capillaria hepatica* existem outros métodos experimentais para induzir a fibrose septal hepática. Um destes modelos é a administração contínua de soro de porco. Este tipo de fibrose septal se desenvolve devido à fração albumina presente neste soro, que estimula as células apresentadoras de antígeno do parênquima hepático como as células de Kupffer e as células dendríticas (CRISPE et al., 2010). As células de Kupffer expressam moléculas co-estimuladoras de baixa densidade incluindo MHC de classe I e de classe II, o que favorece a ativação de células T (YOU et al., 2008). Estudos utilizando esta metodologia revelaram que este tipo de fibrose septal possui uma base imunológica, pois Bunchet et al., (1996) observaram que o tratamento frequente com injeções intraperitoneais com soro de porco induziu fibrose septal em ratos adultos, porém ratos que receberam injeções do soro de porco quando neonatos (tolerantes) não desenvolveram fibrose septal se tratados na fase adulta.

As alterações morfológicas observadas na fibrose septal induzida pela injeção intraperitoneal de soro de porco em ratos, e na fibrose septal induzida pela infecção com *C. hepatica* parecem ser bem semelhantes, sugerindo que o

mecanismo envolvido nos dois modelos têm uma base imunológica. Estudos realizados pelo nosso grupo já demonstraram que a fibrose septal causada pela infecção por *C. hepatica* e as lesões teciduais causadas por este helminto seguem linhas de evolução independentes, o que sugere diferentes mecanismos. Esses estudos demonstraram que a quantidade de fibrose septal não sofria alteração quando os mesmos animais eram submetidos a reinfecções (OLIVEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2001).

Diante dos achados de OLIVEIRA e colaboradores (2004), decidimos desafiar ratos com extratos (de ovo, de verme e de ovo+verme) de *C. hepatica* na tentativa de induzir uma resposta celular frente a esta sensibilização que fosse capaz de desencadear o processo de fibrogênese hepática. Entretanto, a introdução de extratos de ovo, de verme e de ovo+verme na corrente sanguínea de ratos não foi capaz de induzir a ativação nem das células estreladas nem dos macrófagos apesar da estratégica posição destas células próximas ao endotélio sinusoidal. Sendo assim, a análise da atividade biológica dos extratos do ovo e do verme deste helminto isolados ou em conjunto não foi capaz de produzir fibrose septal em ratos.

Nossas análises histológicas exibiram tecidos hepáticos com uma intensa reação inflamatória a partir do 18^o dia pós-infecção. O helminto *C. hepatica* passa por diferentes estágios até atingir a sua maturidade sexual no fígado do hospedeiro (GALVÃO, 1981). Até o seu amadurecimento sexual no fígado, o verme pode gerar diferentes respostas imunológicas, e conseqüentemente diferentes fenótipos de macrófagos neste órgão. Em estudos experimentais que avaliaram a resposta do hospedeiro a antígenos do *Schistosoma mansoni* os resultados obtidos revelaram que o antígeno de ovo (SEA) induzia uma forte resposta das células T *in vitro* (LUKACS & BORO, 1991; VAN LIEMP et al., 2007).

Santos et al., (2001), em um estudo sobre a contribuição dos fatores parasitários na fibrose septal induzida por *C. hepatica*, obtiveram resultados similares aos nossos, pois nesta pesquisa eles constataram que os ovos e os vermes de *C. hepatica* sozinhos eram incapazes de gerar fibrose septal, eles

também verificaram que quando os animais infectados eram tratados ao 15^o dia de infecção ou seja, antes de atingirem a maturidade sexual ou antes da oviposição a fibrose septal não era estabelecida. Estes dados sugerem que para o estabelecimento da fibrose septal induzida por este helminto é necessário a ativação de fatores desencadeadores de resposta imune liberados pelo ovo e pelo verme.

Macrófagos possuem um papel decisivo na evolução da fibrose hepática (MATSUOKA et al., 1990, CHENG et al., 2016). Para esclarecer e entender os mecanismos utilizados por estas células, diversos estudos utilizam o modelo de depleção experimental de macrófagos para avaliar o papel destas células em processos fibrogênicos (DE LA DURANTAYE et al. 2014; DUFFIELD et al., 2005). O Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$) é um dos fármacos mais utilizados para a depleção de macrófagos em modelos experimentais, embora não promova a morte celular, tal substância parece interferir na atividade fagocítica e na atividade da peroxidase das células macrófágicas (NEYRINCK, 2004; LI et al., 2009; KIRIAKOU et al., 2013; CHEN et al., 2012).

Os dados obtidos no presente estudo, com o tratamento de ratos com o Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$), revelaram que após o tratamento com este fármaco, não houve diferença na quantidade de macrófagos quando comparados com o grupo controle. As amostras de fígado submetidas a imunomarcagem para CD68 revelaram a presença de macrófagos tanto na região dos septos fibrosos quanto na região portal e pericentral indicando, desta forma, a falha deste fármaco em depletar os macrófagos no modelo em questão. Além disso, avaliamos se o tratamento com Cloreto de Gadolínio interferiu no processo de fibrogênese induzido pela infecção helmíntica e verificamos que o processo fibrótico ocorreu sem interrupções nos animais tratados.

Os achados obtidos com o tratamento com $GdCl_3$ não foram satisfatórios. Isso nos induziu a desenvolver um novo estudo de depleção utilizando um novo fármaco. A substância de escolha foi o Diclorometileno Difosfonato (Cl_2MDP). Tal composto age via apoptose, resultando na

depleção celular (VAN ROOIJEN & SANDERS, 1994; VAN ROOIJEN & HENDRIKX, 2010). Diversos estudos indicam o uso do Diclorometileno Difosfonato como uma boa metodologia para a depleção de células macrofágicas, já que este induz a apoptose celular (RANG et al., 2001; SNOEYS et al., 2006). Golbar et al (2016) verificaram através de reação imuno-histoquímica para CD68 que houve uma diminuição expressiva de células macrofágicas hepáticas em ratos tratados com Tioacetamida (indutor de fibrose hepática) e submetidos à depleção macrofágica através do Cl₂MDP.

Os dados obtidos no presente estudo revelaram que o tratamento de ratos com o Cl₂MDP foi capaz de depletar mais de 80% dos macrófagos hepáticos. Em animais infectados com *C. hepatica* e tratados com Cl₂MDP também houve redução do número de macrófagos no tecido hepático. Para confirmar estes achados, a quantidade de macrófagos foi avaliada através da imunomarcagem com CD-68. A análise estatística destes dados revelou diferenças significativas na quantidade de macrófagos entre o grupo infectado não tratado e o grupo tratado infectado, e também depletado. Os animais infectados com *C. hepatica* e tratados com Cl₂MDP desenvolveram menos fibrose septal em relação aos animais não tratados. Estes resultados sugerem que os macrófagos são importantes para o estabelecimento da fibrose septal neste modelo. Estes achados estão em conformidade com os resultados de Yang e colaboradores (2015) que concluíram que a depleção através de Cl₂MDP das células de Kupffer em camundongos BALB/c infectados com *Schistosoma Japonicum*, interferiu na capacidade destes animais em desenvolver fibrose, além de reduzir significativamente a geração de granulomas, confirmando a importância deste macrófagos teciduais no processo de fibrose.

A depleção das células de Kupffer está relacionada com a diminuição de fibrose em diversos modelos (MURIEL & ESCOBAR 2003; EDWARDS et al., 1993). A depleção das células de Kupffer interfere em diversos processos biológicos do fígado, uma vez que esta célula participa no processo de síntese

de vários mediadores inflamatórios. Quando ativados, os macrófagos são importantes produtores de TNF- α que, sabidamente, participa do processo de ativação das células estreladas e conseqüentemente, do processo de fibrogênese hepática (ZHU et al., 1995).

Existe uma forte interação entre as células de Kupffer e as células estreladas hepáticas, pois a ativação das células estreladas induz a ativação das células de Kupffer. Ambas as células expressam TLR3 e a ativação deste receptor Toll nas células estreladas e de Kupffer atenua a lesão hepática causada por álcool (BYUN et al., 2013). Em um recente estudo ROTH et al (2015) demonstraram que o fator indutor de hipóxia-1 alfa (HIF1- α) expresso pelas células estreladas hepáticas é um fator essencial para a ativação das células de Kupffer após lesão. Neste estudos eles demonstraram que hepatócitos necróticos induziam a ativação de HIF-1 em células estreladas *in vitro*, pois o tratamento de células de Kupffer com meio condicionado de células estreladas expostas a hepatócitos necróticos interferiu na síntese de CXL2 e outras citocinas inflamatórias nas células de Kupffer. Indicando a importância que a interação entre essas duas células tem para o processo de reparo.

Neste modelo experimental observamos que em animais submetidos à depleção macrófagica induzida por Cl₂MDP, a quantidade de células estreladas/miofibroblastos ativados foi expressivamente reduzida, o que conseqüentemente interferiu na produção de colágeno. Possivelmente isso se deveu ao fato de que a ativação das células estreladas resultou da combinação de estímulos parácrinos gerados pelas células do parênquima hepático, incluindo as células de Kupffer. Estes dados sugerem que os macrófagos participam na ativação dos miofibroblastos durante o desenvolvimento da fibrose septal induzida por *C. hepatica*.

Em diversas doenças infecciosas as principais manifestações histológicas estão relacionadas com a ação do agente infeccioso e da resposta imune gerada. Devido à diversidade de antígenos presentes nos parasitas, a resposta imune inata e adaptativa são prontamente ativadas (TOSI, 2005). Uma das principais células atuantes neste processo é a célula

macrofágica. Para que esta célula seja ativada, diversas moléculas e vias de sinalização são requeridas e uma das mais importantes moléculas requeridas na ativação dos macrófagos é a L-arginina (THOMAS et al.,2007).

A L-arginina é um aminoácido que participa de inúmeros processos metabólicos incluindo a síntese de proteínas (PEKAROVA & LOJEK, 2015). A arginina faz parte do metabolismo de diversas células imunológicas. Esta molécula parece estar relacionada com a proliferação de linfócitos e com as propriedades funcionais das células *Natural Killer* (WU et al.,1992). A L-arginina também contribui diretamente na ativação de macrófagos. Estudos feitos com células macrofágicas de rato revelaram que a arginina parece contribuir para o processo anti-inflamatório (BONHOMME et al.,2013). Entretanto, macrófagos estimulados por bactérias ou citocinas pró-inflamatórias requerem arginina para produção de NO e de interleucinas (PEKAROVA et al., 2009; PERANZONI et al., 2008).

Macrófagos classicamente ou alternativamente ativados sintetizam enzimas que degradam a L-arginina, sendo que macrófagos classicamente ativados produzem óxido nítrico sintetase e macrófagos alternativamente ativados produzem arginase. Acredita-se que a arginase produzida por M2 participe da regulação da iNOS por competição do substrato (MONTOVANI et al., 2001; MUNDER et al., 1999). Em macrófagos alternativos, a arginase participa do processo de regulação de iNOS modulando a concentração de L-arginina (GOMEZ-NIETO, 2001). Um método utilizado pelos macrófagos para combater as infecções é o estresse oxidativo causado pela fagocitose. Sendo assim, a produção de iNOS é fundamental para o desfecho da resposta imune. Esta regulação depende diretamente do tipo de resposta Th1 ou Th2, as quais irão induzir a síntese de diferentes moléculas que determinam o direcionamento do metabolismo da arginina (LICHTMAN, 2007).

No nosso estudo, a expressão de marcadores de macrófago foram utilizados para avaliar a polarização destas células durante a estimulação com extratos do ovo, do verme ou do ovo+verme. Em diversas infecções helmínticas a resposta Th1 pode ser predominante no início da infecção,

enquanto não há ovos. Entretanto, após o aparecimento dos ovos a resposta Th2 predomina (XU et.al., 2014). Estudando aspectos imunológicos da resposta do hospedeiro ao *Schistosoma japonicum*, JI e colaboradores (2006), demonstraram que no início da infecção foi desenvolvida uma resposta Th1 com forte presença de IFN-gama, mas com a progressão da infecção a resposta foi invertida para Th2.

Monócitos inflamatórios e macrófagos residentes são elementos chaves nos processos de regeneração e fibrose (WYNN & BARRON, 2010). Macrófagos são importantes produtores de citocinas, matriz extracelular e outros mediadores inflamatórios que fazem parte da resposta celular. Eles também produzem sinais que estimulam fibroblastos a se diferenciarem em miofibroblastos, colaborando diretamente para a síntese de matriz extracelular (MURRAY & WYNN, 2011).

Macrófagos alternativamente ativados são caracterizados pela síntese da enzima arginase-1 (Arg-1) (CHINETTI et al., 2011). A Arg-1 exerce um papel decisivo na função imunológica das células M2, pois é a ação desta enzima que promove a hidrólise da L-arginina em ornitina, que por sua vez está relacionada com a síntese de colágeno. Sendo assim, todo este processo está ligado ao reparo tecidual e fibrose (MUNDER, 2009).

Nossas observações revelaram que no modelo *in vitro* os macrófagos primários de rato estimulados somente com extrato de ovo ou extrato de ovo+verme promoveram o aumento da expressão de arginase-1. O aumento na expressão de arginase-1 está intimamente relacionado com a resposta anti-inflamatória. Esses achados indicam que o extrato do ovo é um importante indutor da polarização macrofágica para um perfil alternativo (M2).

Semelhante a outras infecções helmínticas a infecção por *Capillaria hepatica* proporciona um ambiente predominantemente Th2 (KIM et al., 2007). Sendo assim, neste estudo, os macrófagos foram induzidos a se diferenciarem em células alternativamente ativadas. Sabe-se que macrófagos

alternativos sintetizam arginase estimulando a produção de ornitina e interferindo na produção de NO (LOKE2007; HESSE 2001).

Nosso estudo também analisou a produção do fator de necrose tumoral (TNF- α) em macrófagos sensibilizados com extratos do ovo, do verme e do ovo+verme de *C. hepatica*. Este fator é uma citocina que induz uma forte resposta celular indutora de mediadores inflamatórios. Este fenômeno é observado em várias doenças, inclusive em hepatites virais e doenças hepáticas não alcoólicas (WAJANT, 2003). Sabe-se que o TNF- α está intimamente relacionado a processos pró-inflamatórios, e que é principalmente produzido por macrófagos, inclusive por células de Kupffer. Além disso, o TNF- α é um importante agente hepatotóxico, pois este fator induz apoptose de células hepáticas tanto *in vivo* como *in vitro* (GRELL et al., 1999; RUDGER 2002).

Durante a fibrose hepática murina causada por colestase o TNF- α aumenta a síntese de colágeno através da indução da síntese de TIMP-1 em células estreladas hepáticas (OSAWA et al., 2013). Na fibrose induzida por tratamento com Tetracloreto de Carbono (CCl₄) a ausência do receptor1 de TNF- α (TNFR1) resultou em redução da depósito de colágeno (SUDO et al., 2005). Em doenças respiratórias crônicas como fibrose cística e asma o TNF- α age promovendo a permeabilização das células epiteliais aumentando a exposição tecidual a antígenos, e aumentando o agravamento dessas doenças (COYNE et al., 2002). Na infecção causada pelo Vírus da Hepatite C (HCV), o TNF- α também causou alteração na conformação da proteína de junção celular facilitando a entrada do vírus na célula, sendo assim células que expressavam altos níveis de TNF- α eram as que possuíam maior quantidade de vírus no seu interior (FLETCHER et al., 2014).

O resultado das observações da expressão gênica de TNF- α em macrófagos sensibilizados com extrato de *C. hepatica* demonstrou que nas primeiras horas após a sensibilização das células, os níveis de TNF- α aumentavam em macrófagos estimulados com extratos de ovo ou de verme. Entretanto, após 24 horas foi observada uma inibição da expressão de TNF-

α , sugerindo que este fator foi inibido com a evolução da resposta. Este achado demonstra claramente o poder inflamatório do extrato proteico do ovo de *C. hepatica* no modelo *in vitro*.

Na infecção humana por *S. mansoni* nos estágios iniciais da infecção (primeira e segunda semana) os níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6 obtidos de células mononucleares de sangue periférico, estão aumentados refletindo assim o domínio da resposta Th1 gerando um ambiente pró-inflamatório (DE JESUS et al., 2002). Entretanto, com a progressão da doença e o surgimento dos ovos a resposta Th2 prevalece (GRZYCH et al., 1991).

No modelo experimental em questão, o pico da resposta inflamatória *in vivo* ocorreu entre a segunda e a terceira semana pós-infecção, o que coincide com o aparecimento de ovos no interior dos vermes e com o surgimento da fibrose septal. O pico da resposta inflamatória, da mesma maneira, também ocorre em infecções causadas por *S. mansoni*, porém em período diferente – na quarta semana pós-infecção que coincide com o início da oviposição (WAREN, 1982).

Os dados apresentados neste trabalho evidenciam que macrófagos participam ativamente na fibrose induzida pela infecção com *C. hepática*. A depleção de macrófagos interferiu na ativação de células estreladas/miofibroblastos e na deposição de colágeno no tecido hepático de animais infetados, indicando uma possível interação entre essas células durante a fibrogênese hepática. Já os dados *in vitro* indicam que antígenos do ovo e do verme favorecem a ativação alternativa de macrófagos, que por sua vez produzem diversos fatores pró-fibrogênicos e pró-angiogênicos contribuindo para a patogênese da fibrose septal induzida pela na infecção por *C. hepatica* em ratos.

CONCLUSÃO

Diante destes achados concluímos que:

-Macrófagos participam ativamente da fibrose septal induzida por *Capillaria hepatica*;

-Os extratos do ovo e do verme de *C. hepatica* isolados ou em conjunto não são capazes de produzir fibrose septal em ratos.

-O Cloreto de Gadolínio ($GdCl_3$) não é um bom depletor de macrófagos em ratos. O tratamento com este fármaco não interferiu no número de macrófagos em nenhum dos grupos tratados nem na evolução da fibrose septal induzida pela capilaríase.

-Diclorometileno Difosfonato (Cl_2MDP) foi eficaz em depletar macrófagos de ratos e em reduzir o teor de colágeno no grupo tratado e infectado quando comparado com o grupo somente infectado.

-A depleção das células macrofágicas causou uma redução de miofibroblastos no parênquima hepático de ratos infectados com *C. hepatica* e consequente diminuição da fibrose.

-O extrato do ovo induziu a produção de $TNF-\alpha$ nas primeiras horas de sensibilização, o que contribuiu para a polarização dos macrófagos para um perfil inflamatório no início da resposta.

-Os extratos de *Capillaria hepatica*, principalmente o extrato de ovo induziu uma resposta inflamatória em macrófagos primários nas primeiras horas de sensibilização. Confirmando a ação inflamatória do ovo. Entretanto com a evolução da resposta os macrófagos primários foram direcionados para um perfil M2.

-Extratos de ovo e verme de *C. hepatica* induziram a síntese de arginase-1, o que indica que antígenos deste helminto induz um perfil alternativo (M2) em macrófagos primários de rato.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE SB, Andrade ZA. Experimental hepatic fibrosis due to *Capillaria hepatica* infection (differential features presented by rats and mice) *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99: 399–406 2004.

ANDRADE ZA. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. *International Journal of Experimental Pathology* 72:553-562, 1991.

ANTHONY B, Jeremy T Allen, Yuesheng S Li and Donald P McManus Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis *Parasites & Vectors* 53:60. 2010.

ANTONIADES CG, Quaglia A, Taams LS, Mitry RR, Hussain M, Abeles R, Possamai LA, Bruce M, McPhail M, Starling C, Wagner B, Barnardo A, Pomplun S, Auzinger G, Bernal W, Heaton N, Vergani D, Thursz MR, Wendon J. *Hepatology*. Source and characterization of hepatic macrophages in acetaminophen-induced acute liver failure in humans. 56(2):735-46, 2012.

ARRIAZU E, Ruiz de Galarreta M, Cubero FJ, Varela-Rey M, Pérez de Obanos MP, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N. Extracellular matrix and liver disease. *Antioxid Redox Signal*. 1;21(7):1078-97, 2014.

ASSIS BC, Cunha LM, Baptista AP, Andrade ZA. A contribution to the diagnosis of *Capillaria hepatica* infection by indirect immunofluorescence test. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(2):173– 177, 2004

BACHEM MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 89(1):19-27, 1992.

- BAECK C, Wei X, Bartneck M et al. Pharmacological inhibition of the chemokine C-C motif chemokine ligand 2 (monocyte chemoattractant protein 1) accelerates liver fibrosis regression by suppressing Ly-6C(+) macrophage infiltration in mice. *Hepatology*. 59:1060-72, 2014.
- BALABAUD C Bioulac-Sage P Desmoulière. A The role of hepatic stellate cells in liver regeneration. *J Hepatol* 40 1023–6, 2004.
- BANSAL MB, Friedman SL. Reversal of Hepatic Fibrosis-Fact or Fantasy? *Hepatology*; 43: S82-88, 2006.
- BARNETT CR, Abbott RA, Bailey CJ, Flatt PR, Ioannides C. Cytochrome P-450-dependent mixed-function oxidase and glutathione S-transfcrase activities in spontaneous obesity-diabetes. *Biochcm Pharmacol* 43:1868–1871,1992.
- BARNETT JL, Appelman HD, Moseley RH. A familial form of incomplete septal cirrhosis. *Gastroenterology* 102:674-678, 1992.
- BAUER M., D. Schuppan. TGFbeta1 in liver fibrosis: time to change paradigms? *FEBS Lett.*, 502, pp. 1–3, 2001.
- BAYLIS HA, on the structure and relashionships of the nematode *Capillaria* (Hepaticola) *hepatica* (Bancroft). *Parasitic* 23: 533-543, 1931.
- BHUNCHET E, Eishi Y, Wake K. Contribution of immune response to hepatic fibrosis induced by porcine serum. *Hepatology* 23:811-817, 1996.
- BILZER, M., Roggel, F. and Gerbes, A. L., Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International*, 26: 1175–1186, 2006.
- BISWAS SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. ;11:889-96, 2010.

BONHOMME, Sandra et al. Arginine-supplemented enteral nutrition in critically ill diabetic and obese rats: a dose-ranging study evaluating nutritional status and macrophage function. *Nutrition*, v. 29, n. 1, p. 305-312, 2013.

BRANCOFT TL On the Whip-worm of the rats liver. *J and Proc. Roy. Soc. New S. Wales.* 27, 86-90, 1893.

BREITKOPF K , P. Godoy , L. Ciucan , M. V. Singer , S. Dooley. TGF- β /Smad Signaling in the Injured Liver. *Z Gastroenterol*; 44(1): 57-66, 2006.

BYUN JS , Suh YG , Yi HS , Lee YS , Jeong WI . Activation of toll-like receptor 3 attenuates alcoholic liver injury by stimulating Kupffer cells and stellate cells to produce interleukin-10 in mice. *Journal of Hepatology* 58(2):342-349, 2013

CAREY E , Carey WD. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleve Clin J Med* ;77(8):519-27, 2010.

CARTER CE, Colley DG. An electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen preparation. *J Parasitol* ;64(3):285-90, 1978.

CASTILLA A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alpha therapy. *N Engl J Med.*;324:933–940, 1991.

CHEETHAM RF, Markus MB. Drug treatment of experimental *Capillaria hepatica* infection in mice. *Parasitology Research* 77:517-520, 1991.

Cheng Y, Tian Y, Xia J, Wu X, Yang Y, Li X, Huang C, Meng X, Ma T, Li J. The role of PTEN in regulation of hepatic macrophages activation and function in progression and reversal of liver fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;317:51-62, 2017.

CHIARAMONTE MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology*;34(2):273-82, 2001.

CHINETTI-GBAGUIDI G., Morgane Baron, Mohamed Amine Bouhlel, Jonathan Vanhoutte, Corinne Copin, Yasmine Sebti, Bruno Derudas, Thérèse Mayi, Gael Bories, Anne Tailleux, Stephane Haulon, Christophe Zawadzki, Brigitte Jude, Bart Staels. Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR γ and LXR α Pathways. *Circulation Research*;108:985-995, 2011.

COYNE, Carolyn B. et al. "Regulation of Airway Tight Junctions by Proinflammatory Cytokines." Ed. Daniel Goodenough. *Molecular Biology of the Cell* 13.9 , 3218–3234, 2002.

Crispe IN. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol*; 54: 357–65, 2011.

DA ROCHA EJG, Basano S de A, de Souza MM, et al. STUDY OF THE PREVALENCE OF *Capillaria hepatica* IN HUMANS AND RODENTS IN AN URBAN AREA OF THE CITY OF PORTO VELHO, RONDÔNIA, BRAZIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*;57(1):39-46, 2015.

DE JESUS, Amelia Ribeiro et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DE LA Durantaye, Mélissa, et al. "Macrophage depletion reduces cell proliferation and extracellular matrix accumulation but increases the ultimate tensile strength of injured Achilles tendons." *Journal of Orthopaedic Research* 32.2: 279-285, 2014.

DEY A, Allen J, Hankey-Giblin PA. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Frontiers in immunology*;5:683, 2014.

DUFFIELD JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*;115(1):56-65, 2005.

EDWARDS MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer in Carbon tetrachloride toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 119(2):275-279.

EL GEBALDY MW, Nassery SF, Azzouni MZ, Hamouda NA, Allam SR. Effect of mebendazole and ivermectin in experimental hepatic capillariasis: parasitological, scanning electron microscopy and immunological studies. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 26:261-274, 1996.

EL NASSERY S, El Gebaly MW, El Azzouni MZ, Hammouda NA, El Shenawie S Effect of mebendazole and ivermectin in experimental hepatic capillariasis B: histopathological and ultrastructural studies. *J Egypt Soc Parasitol*;26:315–26,1996.

Elsharkawy, A., Abdel Alem, S., Fouad, R., El Raziky, M., El Akel, W., Abdo, M., Tantawi, O., AbdAllah, M., Bourliere, M., and Esmat, G. Changes in Liver stiffness measurements and Fibrosis scores following Sofosbuvir based treatment regimens without Interferon. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017

EMILY CAREY, DO , William D. Carey, MD, Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Vol 77 – 2010.

FARHANG-AZAD, Abdulrahman. Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). II. Egg-Releasing Mechanisms and Transmission. *The Journal of Parasitology*. Vol. 63, No. 4 , 1977, pp. 701-706.

FERREIRA LA, Andrade ZA. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88: 441– 447, 1993.

FLETCHER, Nicola F. et al. Activated macrophages promote hepatitis C virus entry in a tumor necrosis factor-dependent manner. Hepatology, v. 59, n. 4, p. 1320-1330, 2014.

FONSECA, Yánnick de Oliveira et al . On the presence of hepatic stellate cells in portal spaces. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro , v. 100, n. 3, p. 289-291, 2000.

FRIEDMAN SL. Liver fibrosis-from bench to bedside. J. Hepatol. 38 (Suppl 1): S38-53, 2003.

FRIEDMAN SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. Gastroenterology. 134:1655-1689, 2008.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol Rev 88, 125–172, 2008.

FRIEDMAN, S.L. Mac the knife? Macrophages - The double-edged sword of hepatic fibrosis. J of Clin Invest, 115 (1), pp. 29-32, 2005.

FUEHRER H, Petra Igel and Herbert Auer *Capillaria hepatica* in man—an overview of hepatic capillariosis and spurious infections Parasitol Res 109(4):969-979, 2011

GALVÃO VA. *Capillaria hepatica*: an evaluation of its pathogenic role in man. Mem Inst Oswaldo Cruz 76(4):415–433, 1981.

GERBER MA, Vernace S. Chronic septal hepatitis. Virchow's Archiv (Pathology. Anatomy. Histology) 362:303-309, 1974.

NASCIMENTO I, Sadigursky M. *Capillaria hepatica*: alguns aspectos imunopatológicos da infecção espúria e da infecção verdadeira. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 19:21-25, 1986.

GOMES AT, Cunha LM, Bastos CG, Medrado BF, Assis BC, Andrade ZA. Capillaria hepatica in rats: focal parasitic hepatic lesions and septal fibrosis run independent courses. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101:895–898, 2006.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. Nature Reviews Immunology 3, 23-35 , 2003.

GRAMADO M Martin AL, Priego T et al. Inactivation of Kupffer cells by gadolinium administration prevents lipopolysaccharide-induced decrease in liver insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 gene expression. J Endocrinol , 188(3) 503-11, 2006.

GREENBAUM LE. Hedgehog signaling in biliary fibrosis. J Clin Invest. Oct;118(10):3263-5, 2008.

GRELL M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, and Strasser A. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. EMBO J 18: 3034–3043, 1999.

GRESSNER AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. Journal of Cellular and Molecular Medicine;10(1):76-99 2006.

GRZYCH, J. M. et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of TH2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 146, 1322–1327, 1991.

GÜLSÜM ÖZLEM. Elpek Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. World J Gastroenterol. 21; 20(23): 7260–7276, 2014.

TANG, N. Mattheos, Y. Yao, Y. Jia, L. Ma and P. Gong. (2015) In vivo osteoprotegerin gene therapy preventing bone loss induced by periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 50:4, 434-443. 2014.

HALL B, Limaye A, Kulkarni AB. Overview: Generation of Gene Knockout Mice. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino*; CHAPTER:Unit-19.1217, 2009.

HERNANDEZ-GEA V & Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*;6:425-56, 2011.

HERNÁNDEZ-GEA V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, Friedman SL Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology*. 142(4):938-46, 2012.

HESSE M., Modolell M., La Flamme A. C., Schito M., Fuentes J. M., Cheever A. W., Pearce E. J., Wynn T. A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J. Immunol.* 167, 6533–6544, 2001.

HEYMANN F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8:307-18, 2009.

Hironaka, K., Sakaida, I., Matsumura, Y., Kaino, S., Miyamoto, K. and Okita, K. Enhanced interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-13) production of Kupffer cell by gadolinium chloride prevents pig serum-induced rat liver fibrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 290–295, 2000.

HOLT MP, Cheng L, Ju C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. *Journal of leukocyte biology*, 84:1410-21, 2008.

HUANG J, Shen XD, Yue S et al. Adoptive transfer of heme oxygenase-1 (HO-1)-modified macrophages rescues the nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) antiinflammatory phenotype in liver ischemia/reperfusion injury. *Molecular medicine*. 20:448-55, 2014.

IONICĂ FE, Mogoantă L, Nicola GC, ChiriȚă C, Negreș S, Bejenaru C, Turculeanu A, Badea O, Popescu NL, Bejenaru LE. Antifibrotic action of telmisartan in experimental carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in Wistar rats. *Rom J Morphol Embryol*. 57(4):1261-1272, 2016.

IREDALE JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest.*;117:539–548, 2007.

IREDALE, J. Defining therapeutic targets for liver fibrosis: Exploiting the biology of inflammation and repair. *Pharmacological Research*, 58 (2), pp. 129-136. 2008.

JARNAGIN WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol.*;127:2037–2048, 1994.

JENNE CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*; 14: 996–1006, 2013.

JI MJ, Su C, Wang Y, Wu HW, Cai XP, Li GF. Characterization of CD4+ T cell responses in mice infected with *Schistosoma japonicum*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*;38:327-34, 2006.

JOCHUM W, Passegue E, Wagner EF. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.*;20:2401–2412, 2001.

JU C, Mandrekar P. Macrophages and Alcohol-Related Liver Inflammation. *Alcohol research : current reviews.* 37:151-62, 2015.

KALINICHENKO VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, Gusarova GA, Kim W, Shin B, Costa RH. Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl₄ injury. *Hepatology.* 37:107–117, 2003.

KAWARATANI H, Tsujimoto T, Douhara A et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators of inflammation.*2013:495156, 2013.

KLAVER EJ, Kuijk LM, Lindhorst TK, Cummings RD, van Die I. Schistosoma mansoni Soluble Egg Antigens Induce Expression of the Negative Regulators SOCS1 and SHP1 in Human Dendritic Cells via Interaction with the Mannose Receptor. Gobert GN, ed. *PLoS ONE.*;10(4), 2015.

KLIRONOMOS, S., Notas, G., Sfakianaki, O., Kiagiadaki, F., Xidakis, C., Kouroumalis, E. Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF- α , TGF- β and PDGF in activated rat hepatic stellate cells. *Regul. Pept.* 188, 5–12, 2014.

KREIDER T, Anthony RM, Urban JF, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology.*19(4):448-453 2007.

KRESSE M, Latta M, Künstle G, Riehle HM, van Rooijen N, Hentze H, Tiegs G, Biburger M, Lucas R, and Wendel A . Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors. *J Immunol* 175: 4076-4083, 2005.

KURAHASHI K, Sawa T, Ota M, Kajikawa O, Hong K, et al. Depletion of phagocytes in the reticuloendothelial system causes increased inflammation and mortality in rabbits with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L198–209, 2008.

KYRIAKOU Loukas G, Konstantinos N Tzirogiannis, Maria D Demonakou, Kalliopi T Kourentzi, Michael G Mykoniatis, Georgios I Panoutsopoulos. Gadolinium chloride pretreatment ameliorates acute cadmium-induced hepatotoxicity *Toxicology and Industrial Health* Vol 29, Issue 7, pp. 624 – 632 2013.

LAZARIDIS KN, Strazzabosco M, Larusso NF. *Gastroenterology*. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. 127(5):1565-77, 2004.

LEE J, French B, Morgan T, French SW. The liver is populated by a broad spectrum of markers for macrophages. In alcoholic hepatitis the macrophages are M1 and M2. *Experimental and molecular pathology*. 96:118-25, 2014.

LEE YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*. 64:830-41, 2015.

LEMOS QT, Magalhães-Santos IF, Andrade ZA. Immunological basis of septal fibrosis of the liver in *Capillaria hepatica*-infected rats. *Braz J Med Biol Res* ; 36:1201-1207, 2003.

LI JY, Xi Gu, Wen-Hai Zhang, Shi Jia and Yong Zhou. GdCl₃ abates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8 (5): 518-523, 2009.

LIASKOU E, Zimmermann HW, Li KK et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology*. 57:385-98, 2013.

LIBBRECHT L, Cassiman D, Desmet V, Roskams T. The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* 22:252–258, 2002.

LOKE P., Gallagher I., Nair M. G., Zang X., Brombacher F., Mohrs M., Allison J. P., Allen J. E. (2007) Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+ T cells to be sustained during chronic infection. *J. Immunol.* 179, 3926–3936, 2007.

LÓPEZ-NAVARRETE G, Ramos-Martínez E, Suárez-Álvarez K, Aguirre-García J, Ledezma-Soto Y, León-Cabrera S, Gudiño-Zayas M, Guzmán C, Gutiérrez-Reyes G, Hernández-Ruíz J, Camacho-Arroyo I, Robles-Díaz G, Kershenobich D, Terrazas LI, Escobedo G. Th2-Associated Alternative Kupffer Cell Activation Promotes Liver Fibrosis without Inducing Local Inflammation. *Int J Biol Sci* 7(9):1273-1286, 2011.

LUCAS T, Ari Waisman, Rajeev Ranjan, Jürgen Roes, Thomas Krieg, Werner Müller, Axel Roers, Sabine A. Eming. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology* April.184 (7) 3964-3977 1, 2010.

LUCKEY SW , Petersen DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol.* 71(3):226-40, 2001.

MACDONALD, Andrew S. et al. CD8– dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 4, p. 1982-1988, 2001.

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

MANDREKAR P. Epigenetic regulation in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology.* 28;17:2456-64, 2011.

MANTOVANI A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* Jan;229:176-85, 2013.

MARGARETE –MENTINK-KANE MM, Cheever AW, Wilson MS, Madala SK, Beers LM, Ramalingam TR, Wynn TA. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology* :141 ,6 , 2200 – 2209, 2011.

MARILIIS Klaas, Triin Kangur, Janeli Viil, Kristina Mäemets-Allas, Ave Minajeva, Krista Vadi, Mikk Antsov, Natalia Lapidus, Martin Järvekülg & Viljar Jaks. The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Scientific Reports* 6, Article number: 27398, 2016.

MARRA F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 119:466–478, 2000.

MARRA F., M. PINZANI . Role of hepatic stellate cells in the pathogenesis of portal hypertension. *Nefrologia (Madr.)* 22 Supl 5:34-40, 2002.

MARTIN Guilliams, Pierre Bruhns, Yvan Saeys, Hamida Hammad & Bart N. Lambrecht. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature Reviews Immunology* 14, 94–108, 2014.

MATSUOKA M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *HEPATOLOGY* 11:599-605, 1990.

MCGUIRE RF, Bissell DM, Boyles J, Roll FJ. Role of extracellular matrix in regulating fenestrations of sinusoidal endothelial cells isolated from normal rat liver. *Hepatology*. 15:989–997,1992.

MCSORLEY HJ, Maizels RM. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 25(4):585-608, 2012.

MEIJER, C; Wiezer, MJ; Diehl, AM; Yang, SQ; Schouten, HJ; Meijer, S; Rooijen, NV; Lambalgen, AAV; Dijkstra, CD; Leeuwen, PAMV Kupffer cell depletion by CI2 MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000.

MELTON AC, Soon RK, Jr, Park JG, et al. Focal adhesion disassembly is an essential early event in hepatic stellate cell chemotaxis. *Am J Physiol*. 293:G1272–G1280, 2007.

MENTINK-KANE MM, Cheever AW, Wilson MS, Madala SK, Beers LM, Ramalingam TR, Wynn TA. Accelerated and Progressive and Lethal Liver Fibrosis in Mice That Lack Interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology* :141 ,6 , 2200 – 2209, 2011.

MUNDER M, F. Mollinedo, J. Calafat, J. Canchado, C. Gil-Lamaignere, J.M. Fuentes, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 105 pp. 2549–2556, 2005.

MURIEL P, Escobar Y Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Japnl. Toxicol* 23:103-108.

MURRAY PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*.41:14–20, 2014.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737, 2011.

NIETO N, Friedman SL, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem.*277:9853–9864, 2002.

OLIVEIRA L, de Souza MM, Andrade ZA. *Capillaria hepatica*-induced hepatic fibrosis in rats: paradoxical effect of repeated infections. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37:123–127, 2004.

OLYNYK, J. K., Yeoh, G. C., Ramm, G. A., Clarke, S. L., Hall, P. M., Britton, R. S., Bacon, B. R. and Tracy, T. F. Gadolinium chloride suppresses hepatic oval cell proliferation in rats with biliary obstruction. *American Journal of Pathology*, 152, 347–352.1998.

OMENETTI A, Porello A, Jung Y, et al. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest.* 118(10):3331-3342, 2008.

OSAWA, Yosuke, et al. "Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells." *PLoS One* 8.6, 2013.

PARONETTO F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunologic reactions. Cirrhosis following immunization with heterologous sera. *The American Journal of Pathology* 40: 1087-1101, 1966.

PEKAROVA, Michaela et al. Continuous electrochemical monitoring of nitric oxide production in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 394, n. 5, p. 1497-1504, 2009.

PERANZONI, Elisa et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology*, v. 212, n. 9, p. 795-812, 2008.

Pereira TA, Xie G, Choi SS, Syn WK, Voieta I, Lu J, Chan IS, Swiderska M, Amaral KB, Antunes CM, Secor WE, Witek RP, Lambertucci JR, Pereira FL, Diehl AM. Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni. *Liver Int. Jan*;33(1):149-61, 2013.

PINZANI M., Marra F. Cytokine Receptors and Signaling in Hepatic Stellate Cells. *Semin Liver Dis.* 21(3): 397-416, 2001.

RAI R M, Yang S Q, McClain C, Karp C L, Klein S, Diehl A M. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Am J Physiol.* 270: G909–18, 1996.

RAI RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology*, 25(4):889-95,1997.

REIMAN RM, Thompson RW, Feng CG, et al. Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity . *Infection and Immunity.* 74(3):1471-1479, 2006.

ROGOSNITZKY M, Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals* ;29:365-376. 2016.

ROSE, M.L.; Bradford, B.U.; Germolec, D.R.; Lin, M.; Tsukamoto, H.; Thurman, R.G. Gadolinium chloride-induced hepatocytes proliferation is prevented by antibodies to Tumor Necrosis Factor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, 39–45, 2001.

ROTH K., Ryan Albee and Bryan Copple. Regulation of Kupffer Cell Activation by Hepatic Stellate Cells. *The FASEB Journal* vol. 29 no. 1 Supplement 53.5 2015.

RUDIGER HA and Clavien PA. Tumor necrosis factor α , but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 122: 202–210, 2002.

SAFADI R, Ohta M, Alvarez CE, Fiel MI, Bansal M, Mehal WZ, Friedman SL. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepato-cytes. *Gastroenterology* 127: 870 – 882, 2004.

SANTOS AB, Tolentino Jr M, Andrade ZA. Pathogenesis of hepatic septal fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 503-506 v. 34, n. 6, 2001 .

SAHA, Banishree et al. Krüppel-like factor 4 is a transcriptional regulator of M1/M2 macrophage polarization in alcoholic liver disease. *Journal of leukocyte biology*, v. 97, n. 5, p. 963-973, 2015.

SCHUPPAN D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* 21:351–372, 2001.

SCHWABE Robert F., Ramón Bataller, David A. Brenner. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285 (5) G949-G958, 2003.

SCIOT R, Staessen D, Van Damme B, Van Steenberghe W, Fevery J, Groote J, Desmet VJ. Incomplete septal cirrhosis: histopathological aspects. *Histopathology* 13:593-603, 1988.

SENOO H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biol Int.* 34(12):1247-72, 2010.

SIKORSKI R, Peters R. Medical literature made easy - Querying databases on the Internet. *JAMA* 277(12):959-60, 1997.

SMART DE, Green K, Oakley F, Weitzman JB, Yaniv M, Reynolds G, Mann J, Millward-Sadler H, Mann DA. JunD is a profibrogenic transcription factor regulated by Jun N-terminal kinase-independent phosphorylation. *Hepatology*. 44:1432–1440, 2006.

SNOEYS J, Mertens G, Lievens J, van Berkel T, Collen D, Biessen EA, De Geest B. 2006. Lipid emulsions potently increase transgene expression in hepatocytes after adenoviral transfer. *Mol Ther* 13:98–107. 10.1016.06.477, 2005.

SOLOMON, G.B. & HANDLEY, C.O. J R. *Capillaria hepatica* (Bancroft,1893) in Appalachian Mammals.*J. Parasitol.*, v.57, n.5, p.1142-1144, 1971.

SOUZA MM, Tolentino-Jr M, Assis BCA, Gonzalez ACO, Correia Silva TM, Andrade ZA. Pathogenesis of Septal Fibrosis of the Liver.(An experimental study with a new model).*Path Res Pract*. 202:883-889, 2006.

SOUZA MM, Tolentino-Jr M, Assis BCA, Gonzalez ACO, Silva TMC, Andrade ZA. Significance and fate of septal fibrosis of the liver.*Hepatol Res*. 35: 31-36, 2006.

STIENSTRA, R., Saudale, F., Duval, C., Keshtkar, S., Groener, J. E. M., van Rooijen, N., Staels, B., Kersten, S. and Müller, M., Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. *Hepatology*, 51: 511–522, 2010.

SUDO, Kaori, et al. "Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice." *Cytokine* 29.5: 236-244, 2005.

TAN HH, Fiel MI, Sun Q, Guo J, Gordon RE, Chen LC, Friedman SL, Odin JA, Allina J. Kupffer cell activation by ambient air particulate matter exposure may exacerbate non-alcoholic fatty liver disease. *J Immunotoxicol*. 6(4):266-75, 2009.

TANG J, Huang H, Ji X, Zhu X, Li Y, She M, Yan S, Fung M, Li Z. Involvement of IL-13 and tissue transglutaminase in liver granuloma and fibrosis after schistosoma japonicum infection *Mediators Inflamm*;7 53483, 2014.

TENENBAUM HC, Shelemay A, Girard B, Zohar R, Fritz PC. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. *J Periodontol*. Jul;73(7):813-22, 2002.

THOMAS AC, Sala-Newby GB, Ismail Y, Johnson JL, Pasterkamp G, Newby AC. Genomics of foam cells and nonfoamy macrophages from rabbits identifies arginase-I as a differential regulator of nitric oxide production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:571–710, 2007.

TIAN S, Chen SY. Macrophage polarization in kidney diseases. *Macrophage*.;2. 2015

TSCHAIKOWSKY K, Brain JD. Effects of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate on macrophage function and endotoxin-induced mortality. *Biochim Biophys Acta*. 21;1222(3):323-30, 1994.

VAN LIEMPT E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M, et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol*; 44: 2605–2615, 2007.

VAN ROOIJEN N, Hendrikx E. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol Biol* ;605:189-203, . 2010.

VAN ROOIJEN N., Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: Mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174, 83–93, 1994.

VIÑAS, Odette, et al. "Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation." *Hepatology* 38.4: 919-929, 2003.

VOGEL. Daphne Y.S, Judith E. Glim, Andrea W.D. Stavenuiter, Marjolein Breur, Priscilla Heijnen, Sandra Amor, Christine D. Dijkstra, Robert H.J. Beelen. Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, Volume 219, Issue 9, Pages 695-703 – 2014.

WAJANT H, Pfizenmaier K, and Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45–65, 2003.

WANG D, Phan N, Isely C, Bruene L, Bratlie KM. Effect of surface modification and macrophage phenotype on particle internalization. *Biomacromolecules*. 10;15:4102-10, 2014.

WARREN, K. S. The secret of immunopathogenesis of schistosomiasis: in vivo models. *Immunol. Rev.* 61:189-213, 1982.

WINAU F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol* 20 (1) 68-74, 2008.

WU, Guoyao; BROSAN, John T. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochemical Journal*, v. 281, n. 1, p. 45-48, 1992.

WYNN TA and Barron L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in liver disease*;30(3):245-257, 2010.

WYNN TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 25;496(7446):445-55, 2013.

XIA X, Demorrow S, Francis H, Glaser S, Alpini G, Marziani M, Fava G, Lesage G. Cholangiocyte injury and ductopenic syndromes. *Semin Liver Dis.* ;27(4):401-12, 2007.

XU J. et al. . Schistosoma japonicum infection induces macrophage polarization. Journal of biomedical research 28, 299–308, 2014.

YAMASHINA S, Wheeler MD, Rusyn I, Ikejima K, Sato N, Thurman RG. Tolerance and sensitization to endotoxin in Kupffer cells caused by acute ethanol involve interleukin-1 receptor-associated kinase. Bio- chem Biophys Res Commun 277:686–690, 2000.

YANG L, Wang Y, Mao H, Fleig S, Omenetti A, Brown KD, et al. Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells. J Hepatol;48(1):98-106, 2008.

YANG Jiang-hua,SUN Jing,LIANG Man-man. Inflammatory response of schistosomiasis hepatic granuloma by inhibiting the function of Kupffer cells. Chinese Journal of Zoonoses, 31(7): 623-626 , 2015.

YONA S, Kim KW, Wolf Y et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity. 24;38:79-91,2013.

YOU Q, Holt M, Yin H, Li G, Hu C-J, Ju C. Role of Hepatic Resident and Infiltrating Macrophages in Liver Repair after Acute Injury. Biochemical pharmacology.;86(6):10.1016, 2013.

YOU Q, L. Cheng, R.M. Kedl, C. Ju. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. Hepatology, 48 (3), pp. 978–990, 2008.

YU MC, Chen CH, Liang X, Wang L, Gandhi CR, Fung JJ, Lu L, Qian S. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7–H1-mediated T-cell apoptosis in mice.Hepatology40: 1312–1321, 2004.

ZARET KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. Nat Rev Genet. 3:499–512, 2002.

ZHENG S, Zhang P, Chen Y, Zheng S, Zheng L, Weng Z Inhibition of Notch Signaling Attenuates Schistosomiasis Hepatic Fibrosis via Blocking Macrophage M2 Polarization. PLoS ONE 11(11), 2016.

ZHOU W-C, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. World Journal of Gastroenterology : WJG.;20(23):7312-7324, 2014.

ZHU X , Zellweger R , Zhu X , Ayala A, Chaudry I H. Cytokine gene expression in splenic macrophages Kupffer cells following haemorrhage. Cytokine; 7: 8–14, 1995.

ZHU Y, Soderblom C, Krishnan V, Ashbaugh J, Bethea JR, Lee JK. Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. Neurobiol Dis.;74:114–25, 2015.