

# QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS EM LESÕES REVERSÍVEIS E IRREVERSÍVEIS DO FÍGADO HUMANO

Brena Elisa de Paulo<sup>1</sup>  
Lenado Branco Rocha<sup>2</sup>

PAULO, B. E. de; ROCHA, L. B. Quantificação de mastócitos em lesões reversíveis e irreversíveis do fígado humano. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 23, n. 2, p. 97-105, maio/ago. 2019.

**RESUMO:** Os mastócitos são células distribuídas pela maior parte do corpo e são reguladores importantes da resposta inflamatória. Nesse estudo o objetivo foi quantificar os mastócitos presentes em fígado humano normal, com esteatose e com cirrose. Foram utilizadas peças de fígado humano do Laboratório de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, onde selecionaram 16 peças anatómicas, dividindo-se em três grupos: fígado normal (controle), com esteatose e com cirrose. Realizou-se a confecção de 32 lâminas, as quais foram submetidas à duas colorações, sendo HE para análise histopatológica, e Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos. Realizou-se análise estatística e a confecção de gráfico, composto pelo número de mastócitos por campo em cada grupo. Observou-se que o aumento da quantidade de mastócitos presentes é diretamente proporcional ao agravo da doença, sendo que a maior população foi encontrada no processo crônico de cirrose hepática. Portanto, subentende-se que exista uma relação intrínseca entre a presença dos mastócitos e, consequente, agravo do processo fibrótico em humanos, de tal modo que uma célula influencie no funcionamento da outra. Torna-se necessário a realização de mais estudos para esclarecerem de forma detalhada tal interação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cirrose hepática. Fígado gorduroso. Hepatócitos. Mastócitos.

## QUANTIFICATION OF MAST CELLS IN REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE HUMAN LIVER LESIONS

**ABSTRACT:** Mast cells are distributed in most tissues of the human body and are key regulators of the inflammatory response. The aim of the study was to quantify the presence of mast cells in healthy human livers and diseased human livers presenting steatosis and cirrhosis. Human liver samples were obtained from the General Pathology Laboratory at the Federal University of Triângulo Mineiro. Sixteen samples were divided into three groups: normal liver (control), steatosis, and cirrhosis. A total of 32 slides were prepared, which were submitted to two stainings, the hematoxylin and eosin (HE) for histopathological analysis, and Toluidine Blue (TB) for mast cell quantification. Statistical analysis and a graph composition were performed, presenting the number of mast cells per field in each group. It was observed that the increase of mast cells is directly proportional to the disease burden, and the greatest increase was found in the population with chronic liver cirrhosis. Therefore, it is understood that there is an intrinsic relationship between the presence of mast cells and the consequent aggravation of the fibrotic process in humans, in such way that one cell influences the functioning of the other. Further studies area necessary in order to clarify such interaction.

**KEYWORDS:** Liver cirrhosis. Fatty liver. Hepatocytes. Mast cells.

## Introdução

O fígado é o segundo maior órgão e a maior glândula do corpo humano, pesa aproximadamente 1.500g em sua fisiologia normal. Os hepatócitos são as células funcionais do fígado e constituem cerca de 67% da sua massa total. Essas células epiteliais encontram-se agrupadas em placas interligadas, formando unidades funcionais, às quais dá-se o nome de lóbulos hepáticos (GEERTS *et al.*, 1989; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; TREFTS; GANNON; WASSERMAN, 2017).

As células hepáticas estão radialmente dispostas nos lóbulos, como se fossem tijolos em uma parede. As placas celulares formadas direcionam-se da região periférica para o centro do órgão, compondo um labirinto. Existem no meio das placas hepáticas capilares denominados sinusoides, os quais a separam entre si. Em seres humanos, os lóbulos encontram-se conectados uns aos outros durante a maior parte de seu cumprimento, o que torna difícil o delineamento exato de cada um. Nas periferias desta estrutura há presença de tecido conjunto envolvendo: vasos sanguíneos, vasos linfáticos, ductos biliares e nervos, o que se chama de espaços porta. O fígado possui de 3 a 6 espaços porta por ló-

bulos hepático (FOX, 2007; GERBER; THUNG, 1987; ITO; SHIBASAKI, 1968).

Esse órgão se localiza na cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma, ao lado direito do corpo humano (FOX, 2007), e desempenha uma série de funções vitais para o organismo, tais como: metabolismo de nutrientes que são absorvidos pelo trato digestivo, processamento e armazenamento, formação e secreção da bile, síntese de proteínas, metabolismo e excreção de diversas substâncias tóxicas, além das funções endócrinas e imunológicas (MARTELLI, 2010). Quando estimulado por células inflamatórias, como neutrófilos, granulócitos e macrófagos, o fígado reage às citocinas liberadas com a produção de proteínas de fase aguda, ou seja, em resposta à inflamação. Essa resposta é chamada de resposta de fase aguda (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A localização do fígado, assim como sua anatomia, o tornam um dos órgãos primários em respostas imunológicas contra processos infecciosos. A defesa imunológica é realizada por meio de interações entre células parenquimatosas, ou hepatócitos, assim como células que apresentam antígenos e células funcionais do sistema imune inato e adaptativo (BULFONE-PAUS; BAHRI, 2015; FRANCESCHINI *et al.*, 2006).

DOI: 10.25110/arqsaude.v23i2.2019.6790

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Graduação em Enfermagem da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Endereço: CENTRO - Praça Manoel Terra, n 330, Uberaba-MG, CEP 38025-015. E-mail: brenaufm@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutor em Patologia Experimental pela Universidade de São Paulo. Atualmente é Professor Adjunto da disciplina de Patologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Endereço: Praça Manoel Terra, 330, Uberaba-MG, CEP 38025-015. E-mail: lenaldo.rocha@uftm.edu.br

Além disso, este órgão possui células que fazem parte do Sistema Reticulo Endotelial (SRE): as células de Kuffer. O SRE é composto por três tipos de células: os neutrófilos, os monócitos e macrófagos (células do sistema fagocitário mononuclear), e os fagócitos órgão-específicos do encéfalo, dos pulmões, linfonodos, baço e do fígado. Assim, as células de Kuffer do fígado são células fixas que se localizam na parede dos sinusoides e fagocitam corpos estranhos à medida que passam pelo fluxo sanguíneo dos capilares (BLESER *et al.*, 1994; FOX, 2007; MINATO; HASUMURA; TAKEUCHI, 1983).

O fígado é capaz de regenerar-se quando se trata de lesões agudas. Os hepatócitos maduros podem retornar ao ciclo celular e passar por várias divisões celulares para formar novamente a massa hepática. Porém, quando o fígado passa por um processo de agressão contínua, subsidiando um dano hepático crônico, a capacidade regenerativa dos hepatócitos é perdida e a consequência mais grave é a insuficiência hepatocelular (FORBES, 2008).

Pode ocorrer pela destruição sucessiva dos hepatócitos associados a um processo inflamatório crônico, ou por dano individual repetitivo ao parênquima. É menos comum, porém eventos de injúria podem se desenvolver de maneira repentina e maciça (como a hepatite viral ou pelo uso de drogas). Em suma, cerca de 80% a 90% da capacidade funcional hepática deve estar comprometida para que ocorra insuficiência do fígado, pois a reserva funcional deste órgão é imensa (FOX, 2007; IIDA *et al.*, 2005).

Em um contexto geral, quando essas células são submetidas à estresse, ou quando são incapazes de se adaptar aos estímulos nocivos, desenvolve-se a lesão celular. Dentro de alguns limites, sendo esta lesão leve e transitória, ela se torna reversível e a célula é capaz de retomar um modo estável. Todavia, uma injúria grave, constante e de início súbito, ocasiona as lesões irreversíveis e a morte celular das células afetadas. Pode ocorrer por necrose ou apoptose, mas independentemente da maneira que aconteça, é um dos eventos mais marcantes no desenvolvimento e agravo das doenças hepáticas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Tem-se como exemplo de lesão reversível as degenerações celulares, decorrentes de alterações bioquímicas com acúmulo de substâncias no interior da célula. Em tal ocasião, exemplifica-se a degeneração celular hepática por acúmulo de lipídios, ou esteatose, mais encontrada no fígado, porque ele é um órgão envolvido no metabolismo da gordura. Pode ocorrer secreção prejudicada de lipoproteínas, aumento da síntese de lipídios, ou até mesmo catabolismo periférico aumentado de gorduras, processos que sentenciam o fígado ao acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos (UNICAMP, 2018).

Dentre diversas etiologias, o consumo de álcool juntamente com uma dieta rica em lipídeos pode elevar os triglicerídeos e ocasionar o acúmulo de lipídios no parênquima hepático (DULY, *et al.* 2015). Além disso, diversas toxinas, a desnutrição proteica, o processo de hipóxia, assim como a obesidade e distúrbios metabólicos genéticos também podem propiciar a esteatose hepática (PINTO *et al.*, 2012).

O acúmulo gorduroso intra-hepático desencadeia uma série de eventos bem específicos, como acúmulo de radicais livres derivados do oxigênio, estresse oxidativo, disfunção das mitocôndrias, produção e a liberação excessiva de

citocinas pró-inflamatórias, assim como a ativação da resposta imune inata, mediada por padrões moleculares associados ao dano (BEIER; ARTEEL; MCCLAIN, 2011; DAY, 2010). Em condições normais, as células do fígado não produzem citocinas ou produzem minimamente. Porém, quando há interferência nessa fisiologia, os hepatócitos são induzidos a produzir estas moléculas mediadoras da inflamação (MARRA; BERTOLANI, 2009).

Como agravo da esteatose hepática, a continuidade de um estímulo nocivo não cessante propicia a morte celular consecutiva de hepatócitos, com extravasamento de compostos celulares que causam uma reação inflamatória aguda no órgão, culminando com a resposta imune às células mortas. O processo inflamatório se torna crônico, há substituição das células hepáticas normais por nódulos parenquimatosos provenientes de novas células hepáticas geradas a partir de células-tronco, e de hepatócitos sobreviventes. Os hepatócitos regenerativos formam nódulos esféricos delimitados por septos fibrosos, que substituem a arquitetura normal do órgão. Assim, há deposição excessiva de matriz extracelular em praticamente todo o órgão e, conseqüente, fibrose difusa como processo cicatricial. A esse evento dá-se o nome de cirrose (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Dentre as diversas causas da cirrose, como agravo de doenças primárias, estão: as hepatites crônicas (virais e autoimunes), doenças de ordem metabólica, vascular ou biliar, além do alcoolismo (IIDA, *et al.* 2005).

Alguns acontecimentos são essenciais para a patogenia da cirrose, como a morte das células hepáticas, a reorganização vascular, e a deposição excessiva de matriz extracelular (MEC), sendo esta última a base da formação da fibrose. Durante o desenvolvimento da cirrose, o processo de fibrose é dinâmico e envolve a produção de MEC, assim como deposição e reabsorção de componentes (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Há evidências de mastócitos desempenhando papel importante no desenvolvimento da fibrose hepática (CLAMAN, 1985). Primeiramente esta célula imunológica era vista apenas como um mediador de reações alérgicas, assim como colaboradora da cicatrização de feridas. Porém, os mastócitos podem estar envolvidos em várias outras reações, além da inflamação, infecção e também outras disordens (BEAVEN, 2009; BOYCE, 2004).

Atualmente os mastócitos são reconhecidos como células primordiais na resposta imunológica, capazes de sintetizar e secretar diversos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Em sua deficiência, os processos de recrutamento de linfócitos T e macrófagos para áreas lesionadas, como no fígado, são atenuados (SMITH *et al.*, 2012).

Em animais, a histamina (amina presente nos mastócitos) eleva a síntese de colágeno nos fibroblastos. E ainda, o aumento dos níveis de histamina no fígado é diretamente proporcional a fibrogênese (BOUCEK; NOBLE, 1977; RUSSELL; RUSSELL; TRUPIN, 1977; UMEZU; YUASA; SUDOH, 1985). Assim, as alterações de quantidade de mastócitos presentes no fígado, e também as mudanças de sua atividade, podem contribuir com o processo de formação da fibrose hepática (FARRELL *et al.*, 1995).

No Brasil, a prevalência das hepatopatias na população não é bem conhecida, e os estudos no país sobre Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica são limitados (MAT-

TEONI *et al.*, 2011). O mecanismo de ação dos mastócitos e seu envolvimento na fisiopatologia das doenças hepáticas, ainda que na fibrose, é pouco abordado. Os estudos que comprovam a interação desta célula na esteatose hepática, e em situações crônicas como na cirrose, estão em sua maioria desatualizados, raramente foram desenvolvidos com anatomia humana e poucas vezes os mastócitos foram quantificados. Existem lacunas ainda não evidenciadas, o que pode contribuir com o agravamento das doenças hepáticas. Por esses fatos, justifica-se a importância deste estudo.

O objetivo do presente estudo foi quantificar os mastócitos presentes em fígado humano normal, com esteatose e com cirrose. E, especificamente: analisar a população de mastócitos presentes nos fígados normal e patológicos, observando a relação da quantidade de células presentes com o desenvolvimento das doenças.

## Material e Métodos

### Aspectos éticos

A pesquisa obedeceu às recomendações da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e do Comitê de Ética em Pesquisa, sendo aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa com o número de CAAE 78709617.0.0000.5154.

### Amostras de fígado

Foram utilizadas peças de fígado humano do Laboratório de Patologia Geral da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, adivindos do serviço de necropsia do Hospital de Clínicas. Foram selecionadas 16 peças anatômicas, e divididas em três grupos: fígado normal (controle), com esteatose e com cirrose.

Foram utilizados como critérios de escolha das peças anatômicas a disponibilidade dessas no arquivo da Patologia Geral; a idade dos pacientes que foram a óbito ser maior ou igual a 18 anos; e ainda fígados que apresentavam apenas esteatose ou cirrose.

Foram excluídos os materiais com outras doenças, se não esteatose ou cirrose hepática, como fígado cardíaco e com neoplasias. Também amostras de indivíduos cuja morte ocorreu com idade inferior a 18 anos.

### Confeção de lâminas

As amostras de fígado foram incluídas em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos e corados com 2 colorações: hematoxilina eosina (HE), e azul de toluidina (AT), sendo a primeira para avaliação histopatológica, assim como confirmação da doença, e a segunda para visualização e consequente quantificação dos mastócitos.

Foram coradas 32 lâminas, sendo que para cada uma das colorações acima foram submetidas 16 cortes.

### Análise histopatológica

A desparafinização das lâminas foi realizada em várias etapas. Primeiro, os cortes foram levados para uma estufa a 45°C por 40 minutos; após mergulharam-se as lâminas

em primeiro soluto, Xilol I e também Xilol II, 10 minutos em cada um. A hidratação foi feita no Álcool Etílico 100%; após em concentrações de 80% e 70%, cada um por 5 minutos. Todo o material foi lavado em água corrente por aproximadamente 7 minutos. Deu-se início a coloração mergulhando as lâminas na Hematoxilina por 3 minutos, após foram lavadas em água corrente por 3 minutos. A próxima coloração foi a Eosina, em que as lâminas ficaram mergulhadas por 7 minutos e novamente foram enxaguadas em água corrente por 2 minutos. A desidratação foi feita primeiramente no Álcool Etílico a 70%, após 80%, cada um por 5 minutos, por último em Álcool Etílico 100%, por 3 minutos, e 100% II por 5 minutos. A fixação do corante e conservação do material foi feita com o mergulho no Xilol I por 5 minutos e novamente no Xilol II por 10 minutos. Após, teve fim com a colagem de lâminas sobre o lado do corte das lâminas.

A leitura no microscópio foi feita somente após a secagem das lâminas, que ocorreu aproximadamente 24 após a confecção quando conservada ao ar livre.

### Microscopia

Para obtenção dos resultados foram utilizadas ferramentas de microscopia óptica e eletrônica, com método de varredura. A análise morfológica foi realizada em um microscópio denominado Zeiss Axiolab (Carl Zeiss GmbH, Alemanha) equipado com uma câmera DFC280 (Leica Microsystems GmbH, Alemanha), e usou-se a objetiva de 20x.

### Coloração azul de toluidina

Para o preparo da solução foi utilizado o corante Azul de Toluidina 0,1%, com 0,1 grama de azul de toluidina, 1ml de ácido acético e 100ml de água destilada, após ajustou-se o pH para 2,8. Como protocolo de coloração, foram utilizadas a solução de vermelho congo e a de azul de toluidina. Primeiro foi feita a desparafinização e hidratação das lâminas, em seguida adicionou-se o vermelho congo e deixou agir por 40 minutos. Após, lavou-se em água destilada, adicionando permanganato de potássio a 0,5% por 2 minutos. O próximo passo, após a nova lavagem em água destilada, foi adicionar metabissulfito de potássio a 2% por 1 minutos, lavou-se em água corrente por 3 minutos e, em seguida, em água destilada duas vezes. Acrescentou-se a solução de azul de toluidina com o pH ajustado para 2,8, por aproximadamente 7 minutos. Por último, foram lavadas em água destilada 2 vezes e desidratadas. Assim como o procedimento anterior, teve fim com a colagem de lâminas sobre o lado do corte das lâminas. A leitura no microscópio foi feita somente após a secagem das lâminas.

### Quantificação de mastócitos

Primeiro selecionou-se uma região com ausência de defeitos, como por exemplo áreas onde não haviam descolamento do material, e após foram fotografados cortes seguidos de cada lâmina, esquivando-se do espaço porta. Pelo tamanho extenso das lâminas, padronizou-se a quantidade de 15 cortes para cada uma. Após, um gráfico do tipo boxplot foi confeccionado a partir da quantificação de mastócitos em cada campo fotografado, e realizou-se a análise estatística.

## Análise estatística

As diferenças entre os grupos, em relação às variáveis do estudo, foram avaliadas por meio da análise de variância ANOVA unicaudal. Quando as amostras não apresentaram distribuição normal, foram submetidas à análise de variância ANOVA unicaudal de postos, pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando houve diferença, os grupos foram comparados entre si com correção de Student-Newman-Keuls para variáveis paramétricas e correção de Dunn para variáveis não paramétricas. Os resultados foram apresentados com média + desvio padrão, para variáveis paramétricas, e sob a forma de mediana e faixa de variação para variáveis não paramétricas. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

## Resultados

### Dados epidemiológicos

Foram incluídos 16 pacientes ao todo, dentre eles, 5 compunham o grupo com esteatose, 7 compunham o grupo com cirrose, e 4 compunham o grupo controle. Os resultados obtidos referentes à análise da população, demonstram que, dentre os pacientes que tinham esteatose hepática, a maioria era do sexo masculino (60%), e tinham idade média de 45 anos. Nos pacientes com cirrose, o grupo era composto em sua maior parte por mulheres (57,14%), e média de 44 anos de idade. E, no grupo controle, a população predominante também era do sexo feminino (75%), apresentou idade média de 42 anos. Em todos os grupos prevaleceram pacientes que se autodeclaravam de coloração branca (dados obtidos dos prontuários).

**Tabela 1:** Dados epidemiológicos da população analisada. A tabela mostra, além dos dados epidemiológicos, a média, a mediana e o desvio padrão referente à análise da população do estudo.

ESTEATOSE						CIRROSE						CONTROLE					
Lâmina	Sexo	Idade (anos)	Cor	Peso corporal (kg)	Peso do fígado (g)	Lâmina	Sexo	Idade (anos)	Cor	Peso corporal (kg)	Peso do fígado (g)	Lâmina	Sexo	Idade (anos)	Cor	Peso corporal (kg)	Peso do fígado (g)
n 4205	M	36	Branca	65	3,700	n 4104	M	26	Branca	51	1,580	n 4153	F	46	Branca	40	1,770
n 4226	M	58	Branca	109	2,730	n 4194	F	44	Branca	66	1,150	n 4311	M	60	Branca	53	2,050
n 4229	M	47	Branca	65	1,950	n 4207	M	65	Branca	70	2,250	n 4319	F	35	Branca	60	1,500
n 4307	F	37	Branca	72	1,880	n 4235	F	53	Branca	84	1,350	n 4326	F	25	Branca	60	1,440
n 4338	F	48	Parda	90	1,150	n 4248	M	34	Branca	63	1,450						
						n 4253	F	54	Branca	74	1,130						
						n 4264	F	29	Branca	55	2,170						
Média		45		80	2,282	Média		44		66	1,583	Média		42		53	1,690
Mediana		47		72	1,950	Mediana		44		66	1,450	Mediana		41		57	1,635
Desvio Padrão		9,04		19,07	0,97	Desvio Padrão		14,55		11,25	0,46	Desvio Padrão		15,02		9,43	0,28

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

### Análise histopatológica

Os mastócitos encontrados nas lâminas foram identificados pela presença de grânulos metacromáticos, geralmente de formato circular e coloração arroxeada.

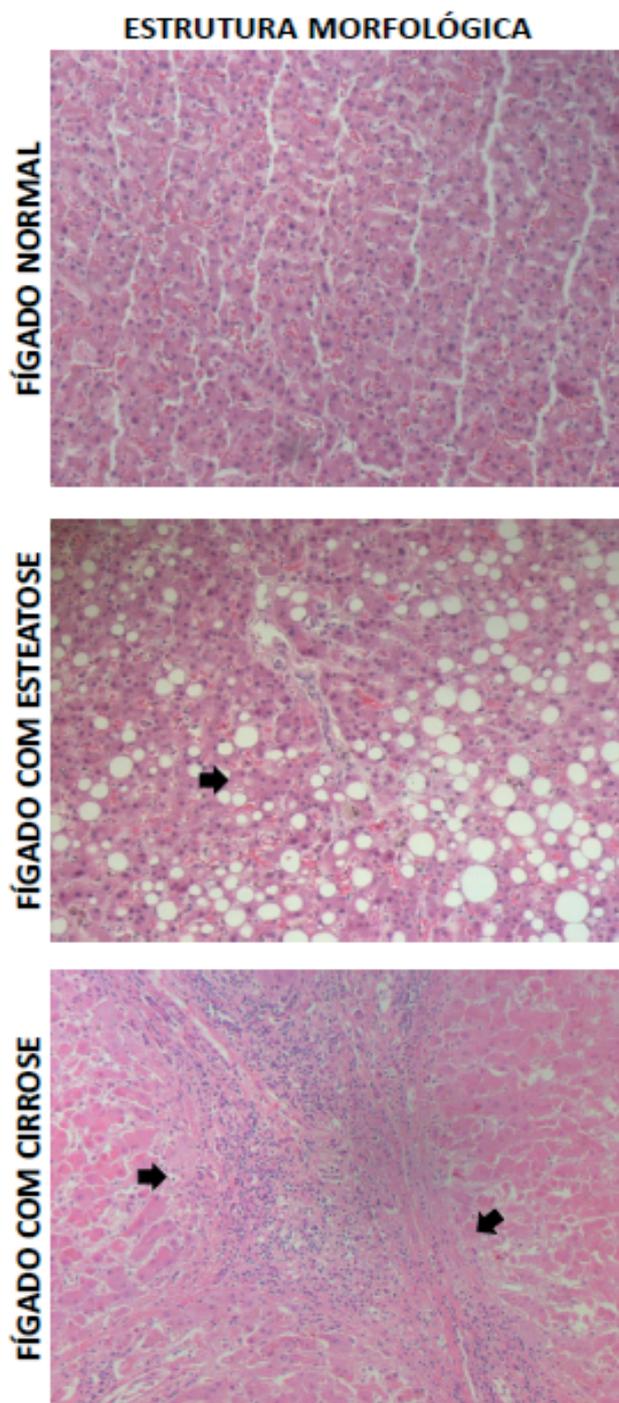
Nas lâminas de material hepático ausentes de patologia os mastócitos se encontravam dispersos pelo parênquima hepático próximo aos hepatócitos, no tecido conjuntivo de vasos e adjacentes ao canal porta-hepático, porém em quantidade mínima. Além disso, essas células faziam parte da fisiologia normal do órgão, já que estes não apresentava nenhuma doença.

Já nas lâminas de fígado com esteatose, observou-se distribuição difusa dos vacúolos lipídicos no parênquima hepático (hepatócitos). A quantidade de mastócitos se elevou de maneira considerável, sendo que estas células estavam espalhadas entre os vacúolos no parênquima hepático em menor quantidade; e em sua maioria se apresentavam tanto no infiltrado inflamatório do órgão, quanto ao redor dos vasos do canal porta-hepático.

Em relação as lâminas de fígado com cirrose, notou-se perda da morfologia lobular normal e aparecimento pseudolóbulos, separados por septos de tecido fibroso com infiltrado inflamatório crônico. Pôde-se observar a presença de maior quantidade de mastócitos comparada as demais. Eles se localizavam nos septos de fibrose, no infiltrado inflamatório crônico e bem próximos ao canal porta-hepático,

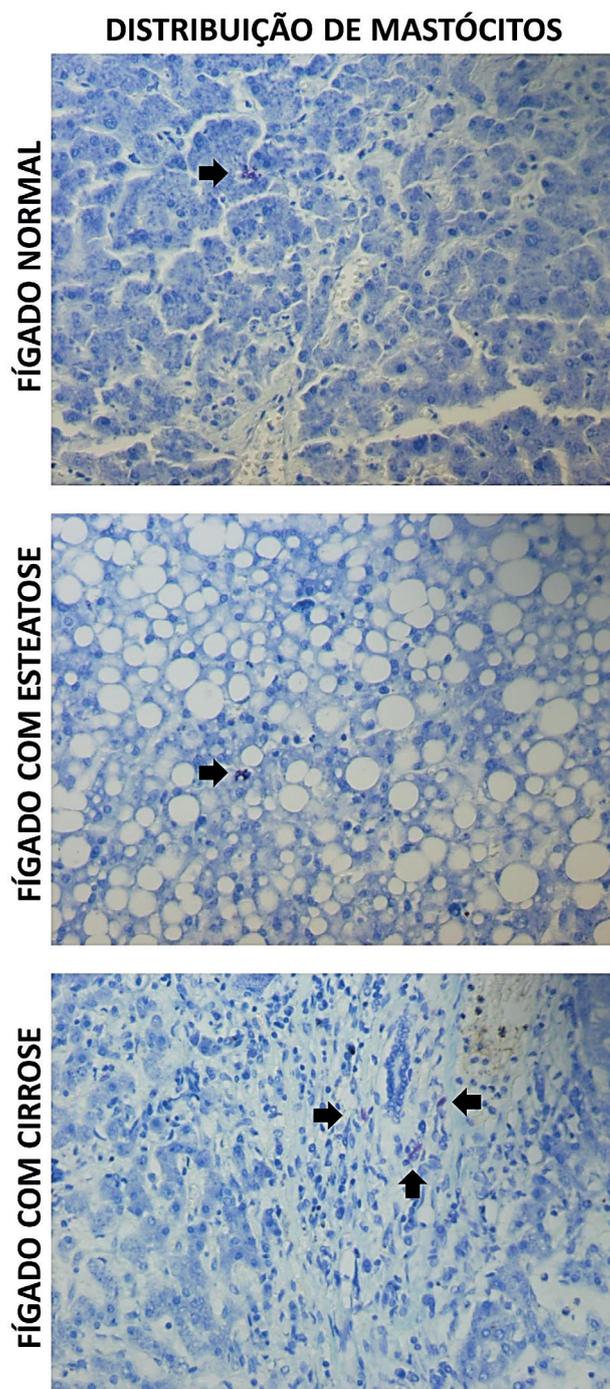
circundando os vasos.

A morfologia do fígado normal, assim como em diferentes processos patológicos (esteatose e cirrose) podem ser visualizados a seguir (Imagem 1), e ainda a distribuição de mastócitos nas mesmas condições (Imagem 2).



**Figura 1:** Foto micrografias representativas do aspecto morfológico de fígados em diferentes processos: normal, com esteatose e com cirrose. As setas mostram os vacúolos de gordura característicos de esteatose hepática, assim como os septos fibrosos, dividindo o fígado em lóbulos hepáticos, condição que ocorre na cirrose.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.



**Figura 2:** Aspecto microscópico da distribuição de mastócitos em fígado normal, com esteatose e cirrose. As setas indicam mastócitos nos diferentes processos do fígado, assim como em sua fisiologia normal.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

### Quantificação de mastócitos

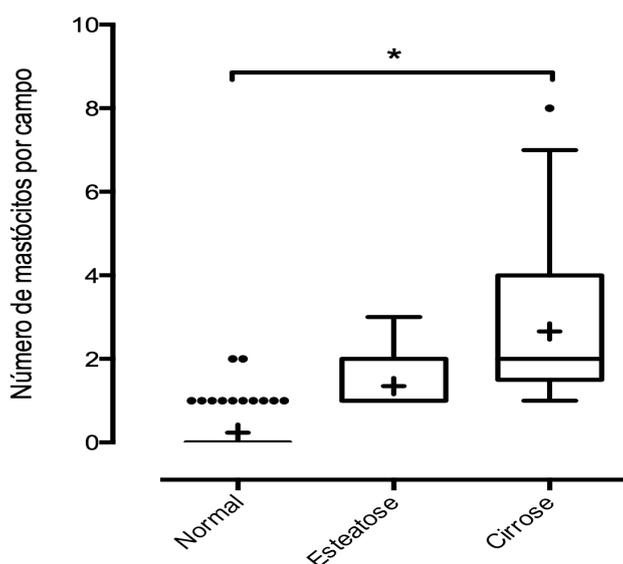
A análise do gráfico quanto à quantificação de mastócitos de fígado normal (grupo 1), houve uma pequena dispersão dos dados quando se observa a diferença de amplitude entre o valor máximo e o valor mínimo do número de mastócitos por campo, variando entre 0 e 2. A mediana não está sendo demonstrada claramente, porém subentende-se que o valor seja igual a 0, e a média dos dados, representada pela cruz, encontra-se pouco acima de 0. Ainda, há presença de

outliers, representados pelos pontos, o que significa que os valores discrepantes do número de mastócitos por campo são aproximadamente iguais a 1 (em maior quantidade) e 2. Dessa maneira, os valores encontram-se assimetricamente distribuídos, sendo que 75% dos campos ou mais se apresentaram sem mastócito algum.

Em relação aos fígados com esteatose (grupo 2), apresentaram valores de amplitude mínimo e máximo próximos de 1 e 3, respectivamente, indicando valor de dispersão dos dados igual a 2, semelhante ao grupo 1. Porém, cerca de 50% dos dados apresentaram número de mastócitos por campo acima de valores iguais a 1, demonstrando um acréscimo na quantidade de mastócitos quando comparada ao grupo controle. Ainda, observou-se a mediana de maneira subjetiva, com valor próximo de 1, e a média com valor aproximadamente igual a 1,5. Não houve presença de dados com valores atípicos neste grupo.

Em relação ao grupo 3, referente aos órgãos com cirrose, o gráfico mostra a presença dos maiores valores referente ao número de mastócitos por campo coletado. Além disso, a variação os dados foi aproximadamente de 1 a 8, tendo valor de dispersão igual a 7. Ademais, 50% dos campos apresentaram valores de número de mastócitos por campo entre 2 e 4, e 25% apresentaram número de mastócitos por campo entre 4 e 8, valor aumentado quando comparado com os demais órgãos. Os dados encontram-se assimetricamente distribuídos quando se observa a mediana, estando próxima de valor igual a 2. A média tem valor próximo de 2,5, enquanto o valor de discrepância é visto igual a 8. Dessa maneira, tem-se um gráfico heterogêneo quando comparado aos demais.

Houve diferença estatística significativa em todos os grupos, em que o valor de p foi menor que 0,05. Tais diferenças são indicadas no gráfico a seguir.



**Figura 3:** Distribuição do número de mastócitos por campo nos diferentes grupos estudados: fígado normal, com esteatose e com cirrose. A média dos dados, em cada grupo, está representada pelas cruces, os outliers, ou pontos discrepantes, estão representados pelos pontos e ainda, o asterisco representa a análise estatística de variância dos dados, com diferenças significativas em todos os grupos.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

## Discussão

Quanto à localização dos mastócitos, este estudo mostrou que nos processos patológicos reversíveis estas células estavam espalhadas entre os vacúolos presentes no parênquima hepático, assim como no infiltrado inflamatório do órgão, e ao redor dos vasos do canal porta-hepático. Já nas alterações irreversíveis, onde existia aumento do processo fibrótico, se localizavam nos septos de fibrose, no infiltrado inflamatório crônico e circundando os vasos do canal hepático.

Tal achado se repete em outra pesquisa, segundo Farrell *et al* (1995) os mastócitos estavam presentes no tecido conjuntivo dos espaços porta, ao lado dos fibroblastos, assim como nas paredes dos capilares da veia porta. Pôde-se observar que pelo menos 10% dos mastócitos estavam revestindo os sinusoides, e ainda, que estavam presentes nas paredes das veias centrais.

Além disso, comprovou-se que a distribuição de mastócitos muda de acordo com o progresso das doenças hepáticas, especialmente em estágios avançados, como na cirrose. Foram notadas alterações marcantes como a maior quantidade de mastócitos presentes nos sinusoides (cerca de 50%) e estas células foram observadas em maior número nas paredes das veias hepáticas. Nos espaços porta, estavam presentes em direção às placas hepáticas, particularmente nos septos fibrosos e nas paredes dos vasos porta-hepáticos. Por conta da sua distribuição, acredita-se que os mastócitos (ou seus produtos) podem influenciar na perfusão intra-hepática, controlando tanto a permeabilidade quanto o diâmetro dos vasos e sinusoides (FARRELL *et al.*, 1995).

No que se refere à população existente de mastócitos, no presente estudo observou-se que os processos patológicos estudados alteram a quantidade destas células no fígado, sendo notado um aumento do número de mastócitos não só em situações onde a lesão ao hepatócito é considerada reversível, como no caso da esteatose, mas principalmente nas alterações irreversíveis, como na cirrose hepática. Foi possível perceber que o acréscimo de mastócitos é diretamente proporcional ao agravo da doença, especialmente no agravo da fibrose hepática.

No entanto, mesmo que em diversos distúrbios, uma grande quantidade de mastócitos esteja associada a um agravo do fenótipo fibrótico (CLAMAN 1990; OVERED-SAYER *et al.*, 2014), pouco se sabe sobre a regulação destas células na fibrose (PINCHA *et al.*, 2018). Acredita-se que o sistema imune inato é um ícone importante na ativação dos fibroblastos. Células imunológicas como neutrófilos, macrófagos e mastócitos (CONESE *et al.*, 2003; GRUBER, 2003; OVERED-SAYER *et al.*, 2014; WYNN; BARRON, 2010), têm sido vistas cada vez mais como fontes de citocinas que ativam fibroblastos, e também de quimiocinas (PINCHA *et al.*, 2018).

Em relação ao processo fibrótico na esteatose hepática, muitos fatores têm sido exemplificados como ofensivos no desenvolvimento da doença, assim como responsáveis pelo aumento da inflamação e agravo da fibrose (JAMES; DAY, 1999). São o caso das citocinas pró-inflamatórias e adipocinas, a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e estresse do retículo endoplasmático, sendo que alguns desses fatores podem ser ocasionados pelos mastócitos (PARADIES, 2014; TARIQ; GREEN; HODSON, 2014). Estas célu-

las têm sido suspeitas de contribuir para o avanço da doença, estando associados a diferentes etiologias hepáticas (FRANCESCINI *et al.*, 2007). Considerando o ambiente inflamatório encontrado ao redor do tecido hepático, é cabível supor que os mastócitos interferem no processo patogênico de acúmulo gorduroso intra-hepático (JARIDO *et al.*, 2017).

Em estudo específico (SMITH *et al.*, 2012), foi avaliado o papel dos mastócitos na progressão da esteatose hepática, e obteve-se resultados demonstrando o envolvimento direto dessas células no processo de agravo da doença. Foi visto que a quimase, protease mastocitária, contribui para a formação de angiotensina II e metaloproteinase de matriz (MMPs), fatores que colaboram com a fibrose hepática.

Em estudo com hamsters (TASHIRO *et al.*, 2010), onde teve-se experimento de indução da doença hepática gordurosa e tratamento com um inibidor de quimase (TY-51469), os autores relatam que o tratamento com o inibidor diminuiu a concentração das enzimas hepáticas séricas, que foram aumentadas após dieta indutiva de esteatose, houve redução do acúmulo de gordura no fígado, e além disso a fibrose presente foi também diminuída. Os mastócitos se apresentaram em maior quantidade após o consumo da dieta experimental, porém esses números foram reduzidos em animais tratados com TY-51469. Este estudo torna evidente a participação dos mastócitos na progressão da Doença Hepática Gordurosa não Alcolólica (DHGNA), bem como demonstra a importância da inibição das proteases presentes nestas células.

No agravo da doença hepática e consequente formação de fibrose cada vez mais difusa, Franceschini *et al* (2006), citam a existência de três fases comuns que ocorrem ao decorrer da lesão: aumento da intensidade da inflamação, produção de matriz extracelular (MEC) e nova modelação tecidual através de fibrogênese dinâmica. Como resultado de uma inflamação crônica, foi notado que os mastócitos realizam função importante na evolução da fibrose no fígado (KORUK *et al.*, 2011). Especificamente, alguns autores demonstraram que os mastócitos podem estar associados à fibrose hepática estimulando a ativação do crescimento de fibroblastos e da síntese de colágeno, podendo também inibir a degradação da MEC por meio de enzimas chamadas de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (FRANCESCINI *et al.*, 2006).

Semelhantemente, Satomura *et al* (2003), também afirmam que a quimase desempenha papel fundamental no desenvolvimento e progressão da fibrose. Por ser encontrada nos grânulos dos mastócitos, acredita-se que esta célula desencadeia o desenvolvimento da fibrose mediante auxílio na diferenciação do tecido conjuntivo, produzindo angiotensina II (AII) a partir da angiotensina I (AI). A AII é capaz de promover a reação fibrótica, induzindo a proliferação de células estreladas hepáticas e produção de MEC. De acordo com o estudo de Jarido *et al* (2017), os mastócitos são responsáveis pela produção de grande quantidade de quimase, por isso estão diretamente interligados à formação da fibrose hepática pela liberação desta citocina. Assim, pressupõe-se que pode ser interessante bloquear a degranulação dos mastócitos para evitar a liberação de quimase, a produção de AII e a subsequente célula estrelada hepática ativando a produção de MEC.

Alguns estudos mostram de maneira mais detalhada

que, os mastócitos apresentam-se com mecanismos de defesa bem específicos. Os grânulos que essas células secretam são preenchidos com uma grande variedade de compostos pré-formados. Quando os mastócitos são ativados para degranular, esses compostos são liberados no ambiente extracelular e podem causar efeito em diversos eventos fisiológicos ou fisiopatológicos (GALLI; NAKAE; TSAI, 2005; METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). De tal modo, quando se leva em conta o impacto funcional da degranulação de mastócitos, é importante destacar que estes grânulos têm um conteúdo repleto de substâncias bioativas e que todos os compostos de grânulos pré-formados são armazenados em sua forma ativa (PALM; ROSENSTEIN; MEDZHITOV, 2012).

Ademais, Wernersson e Pejler (2014), ilustram que a degranulação de mastócitos leva a uma poderosa resposta pró-inflamatória, em parte mediada pelos compostos de grânulos pré-formados, como histamina e várias citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF) e proteases específicas de mastócitos, além da quimase, triptases e carboxipeptidase A3 (CPA3). Os compostos de grânulos, em particular as proteases, podem ter efeitos extensivos na matriz extracelular (MEC). Por exemplo, as proteases de mastócitos podem estimular a formação da fibrose, aumentando a deposição de MEC pela ativação do receptor-ativador de protease (PAR2) nos fibroblastos (induzindo assim a síntese de colágeno), ou ainda pela ativação do fator de crescimento transformador pró-fibrótico (TGF- $\beta$ ).

Nos últimos anos foi visto que, além das substâncias moleculares secretadas por mastócitos serem ativadoras de fibroblastos (ARTUC; STECKELINGS; HENZ, 2002; GARBUZENKO *et al.*, 2004), uma adesão direta entre essas duas células é considerada um pré-requisito para a sua ativação (KOMA *et al.*, 2005; TRAUTMANN *et al.*, 1998). Porém, o mecanismo que subsidia o acréscimo da concentração de mastócitos no tecido fibrótico, assim como o motivo de sua adesão aos fibroblastos e consequente agravo da fibrogênese, esteve pouco descrito até então (PINCHA *et al.*, 2018).

Contrapondo, um estudo específico (BRADDING; PEJLER, 2018), evidenciou que os mastócitos podem executar papéis diferentes no desenvolvimento fibrótico. Os dados clínicos humanos e dados *in vitro* se inclinaram para um papel pró-fibrótico desenvolvido por mastócitos, enquanto os modelos animais foram inconsistentes. Os modelos animais que inibiram a quimase, em particular, comprovaram que esta protease desempenhou um papel pró-fibrótico em lesões fibróticas humanas, assim como os mastócitos expressando tanto triptase quanto quimase. Aponta-se como um dos motivos principais para tal ocorrência, o fato de que o objetivo dos mastócitos residentes é detectar lesões e então iniciar um programa coordenado de lesão e reparo. Quando este cenário é permitido progredir naturalmente, e o estímulo prejudicial é de curta duração, os mastócitos exercerão, em geral, atividade antifibrótica, causando aí a discrepância. Em contraste, quando o estímulo prejudicial é crônico ou repetido, diversos mediadores pró-fibróticos são liberados minuto a minuto para causar danos e levar à fibrose tecidual.

## Conclusão

Em humanos, torna-se claro que o aumento do nú-

mero de mastócitos é proporcional ao agravo da doença hepática, tendo em vista que o processo inflamatório crônico apresentou a maior quantidade de célula já vistas. Dessa maneira, subentende-se que existe uma relação intrínseca entre a presença dos mastócitos e, conseqüente agravo do processo fibrótico, de tal modo que uma célula influencie no funcionamento da outra, exercendo um papel pró-fibrótico. Torna-se necessária a realização de mais estudos com dados humanos, para esclarecerem de forma detalhada tal interação.

## Referências

ABBAS, A K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015, 552 p.

ARTUC, M.; STECKELINGS, U. M.; HENZ, B. M. Mast cellfibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 118, n. 3, p. 391–395, 2002.

BEAVEN, M. A. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 11-25, 2009.

BEIER, J. I.; ARTEEL, G. E.; MCCLAIN, C. J. Advances in Alcoholic Liver Disease. **Current Gastroenterology Reports**, v. 13, n. 1, p. 56-64, 2011.

BLESER, P. J. *et al.* Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. **Gut: Journal of the British Society of Gastroenterology**, v. 35, n. 11, p. 1509-1516, 1994.

BOUCEK, R. J; NOBLE, N. L. Histamine, norepinephrine and bradykinin stimulation of fibroblast growth and modification of serotonin response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 144, p. 929-933, 1977.

BOYCE, J. A. The biology of the mast cell. **Allergy & Asthma Proceedings: Medical Journals**, v. 25, p. 27-30, 2004.

BRADDING, P.; PEJLER, G. The controversial role of mast cells in fibrosis. **Immunological Reviews**, v. 282, n. 1, p. 198–231, 2018.

BULFONE-PAUS, S.; BAHRI, R. Mast Cells as Regulators of T Cell Responses. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. 394, 2015.

CLAMAN, H. N. Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 1, p. 141-151, 1990.

CLAMAN, H. N. Mast cells, T cells and abnormal fibrosis. **Immunology Today**, v. 6, n. 6, p. 192-195, 1985.

CONESE, M. *et al.* Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung

disease. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 2, n. 3, p. 129-135, 2003.

DAY, C. P. Genetic and environmental susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 1, p. 255–260, 2010.

DULY, A. M. P. *et al.* Effect of multiple binge alcohol on diet-induced liver injury in a mouse model of obesity. **Nutrition & Diabetes - Nature**, v. 5, n. 4, p. 154, 2015.

FARRELL, D. J. *et al.* Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. **Hepatology**, v. 22, p. 1175-1181, 1995.

FORBES, S. J. Stem cell therapy for chronic liver disease - choosing the right tools for the job. **Gut**, v. 57, n. 2, p. 153–155, 2008.

FRANCESCHINI, B. *et al.* The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, p. 2248-2256, 2006.

FRANCESCHINI, B. *et al.* Increased liver mast cell recruitment in patients with chronic C virus-related hepatitis and histologically documented steatosis. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 14, n. 8, p. 549-555, 2007.

FOX, S. I. *Fisiologia Humana / Stuart Ira Fox*. 7. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2007, 726 p.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 6, n. 2, p. 135-142, 2005.

GARBUZENKO, E. *et al.* Mast cells induce activation of human lung fibroblasts in vitro. **Experimental Lung Research**, v. 30, n. 8, p. 705–721, 2004.

GEERTS, A. *et al.* *In vitro* differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. **Journal of Pathology**, v. 9, n. 1, p. 59-68, 1989.

GERBER, M. A.; THUNG, S. N. Histology of the liver. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 11, n. 9, p. 709-722, 1987.

GRADUAÇÃO, Patologia Geral - DB-301, Unidade I, FOP/UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: [https://w2.fop.unicamp.br/ddo/patologia/db301\\_patologia\\_geral.htm#unidade3](https://w2.fop.unicamp.br/ddo/patologia/db301_patologia_geral.htm#unidade3). Acesso em: 29 mar. 2018.

GRUBER, B. L. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. **Current Rheumatology Reports**, v. 5, n. 2, p. 147-153, 2003.

IIDA, V. H. *et al.* Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2005.

ITO, T.; SHIBASAKI, S. Electron microscopic study on the

- hepatic sinusoidal wall and the fat-storing cells in the normal human liver. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 29, n. 2, p. 137-192, 1968.
- JAMES, O.; DAY, C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. **The Lancet**, v. 353, n. 9165, p. 1634-1636, 1999.
- JARIDO, V. *et al.* The emerging role of mast cells in liver disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 313, n. 2, p. 89-101, 2017.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 538 p.
- KOMA, Y. *et al.* Distinct role for c-kit receptor tyrosine kinase and SgIGSF adhesion molecule in attachment of mast cells to fibroblasts. **Laboratory Investigation**, v. 85, n. 3, p. 426-435, 2005.
- KORUK, S. T. *et al.* Increased liver mast cells in patients with chronic hepatitis C. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 736-740, 2011.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 604 p.
- MARRA, F.; BERTOLANI, C. Adipokines in liver diseases. **Hepatology**, v. 50, n. 3, p. 957-969, 2009.
- MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lipídeos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 1, p. 55-59, 2010.
- MATTEONI, L. *et al.* Doença hepática gordurosa não alcoólica: importância da ultrassonografia abdominal no diagnóstico. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 81, n. 1, p. 7-9, 2011.
- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.
- MINATO, Y.; HASUMURA, Y.; TAKEUCHI, J. The Role of Fat-Storing Cells in Disse Space Fibrogenesis in Alcoholic Liver Disease. **Hepatology**, v. 3, n. 4, p. 559-566, 1983.
- OVERED-SAYER, C. *et al.* Are mast cells instrumental for fibrotic diseases? **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, n. 174, 2014.
- PALM, N. W.; ROSENSTEIN, R. K.; MEDZHITOV, R. Allergic host defences. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 465-472, 2012.
- PARADIES, G. *et al.* Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14205-14218, 2014.
- PINCHA, N. *et al.* PAIL mediates fibroblast-mast cell interactions in skin fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 5, p. 1807-1819, 2018.
- PINTO, C. G. S. *et al.* Esteatose Hepática e Estilo de Vida Ativo: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 20, n. 3, p. 125-134, 2012.
- RUSSELL, J. D.; RUSSELL, S. B.; TRUPIN, K. M. The effect of histamine on the growth of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue. **Journal of Cellular Physiology**, v. 93, p. 389-393, 1977.
- SATOMURA, K. *et al.* Increased chymase in livers with autoimmune disease: colocalization with fibrosis. **Journal of Nippon Medical School**, v. 70, n. 6, p. 490-495, 2003.
- SMITH, D. D. *et al.* Mast cell deficiency attenuates progression of atherosclerosis and hepatic steatosis in apolipoprotein E-null mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 12, p. H2612-H2621, 2012.
- TARIQ, Z.; GREEN, C. J.; HODSON, L. Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression from hepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)? **Liver International**, v. 34, n. 7, p. 180-190, 2014.
- TASHIRO, K. *et al.* Chymase inhibitor prevents the nonalcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet. **Hepatology Research**, v. 40, n. 5, p. 514-523, 2010.
- TRAUTMANN, A. *et al.* Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 10, p. 5053-5057, 1998.
- TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology Magazine**, v. 27, n. 21, p. R1141-R1155, 2017.
- UMEZU, K.; YUASA, S.; SUDOH, A. Change of hepatic histamine content during hepatic fibrosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 34, p. 2007-2011, 1985.
- WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478-494, 2014.
- WYNN, T. A.; BARRON, L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 3, p. 245-257, 2010.

Recebido em: 18/05/2018

Aceito em: 29/11/2018