AMANDA OLIVOTTI FERREIRA

Análise das vias de administração e de biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial

São Paulo

2016

AMANDA OLIVOTTI FERREIRA

Análise das vias de administração e de biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dra. Maria Angélica Miglino

Coorientador:
Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3304
FMVZ

Ferreira, Amanda Olivotti
Análise das vias de administração e biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial / Amanda Olivotti Ferreira. -- 2016.
77 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dra. Maria Angélica Miglino.

Coorientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

1. Célula derivada do broto hepático. 2. Hepatectomia parcial. 3. PET Scan. 4. Regeneração hepática. 5. Citometria de fluxo. I. Título.

CERTIFICADO BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise das vias de administração e biodistribuição de células embrionárias derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial", protocolado sob o nº 2590/2012, utilizando 200 (duzentos) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, foi referendado em 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Analysis of embryonic routes of administration and biodistribution cell derived from the liver bud of mice in models of partial hepatectomy", protocol number 2590/2012, utilizing 200 (two hundred) rats, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angelica Miglino, was approved and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 3 de março de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7678/0904
Fax: +55 11 3032-2222
e-mail: ceuaven@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FERREIRA, Amanda Olivotti

Título: Análise das vias de administração e de biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas, Sofia e Luísa, que são a razão da minha vida. As duas que vieram ao mundo nesta fase tão difícil de minha vida, me trazendo ensinamentos e uma enorme felicidade em descobrir a maternidade e o prazer de ser mãe.

Ao meu marido Bruno, por toda insistência em me fazer continuar, por todo carinho e companheirismo nessa fase tão difícil, que parecia não ter fim. Nosso relacionamento passou por altos e baixos durante esse tempo, mas conseguimos chegar juntos no final, isso demonstra o quanto nosso amor é verdadeiro e resistente às tempestades da vida. Obrigada pela paciência e pelo amor, meu TDB! Nossa família sempre foi e será meu bem mais valioso.

Fiz isso por vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Durvanei Augusto Maria, meu ídolo! Por tudo de bom que todos esses anos ele fez por mim e pela minha família. Um exemplo de gente boníssima, alto astral, educado, prestativo, amigo e que me ajudou sempre além do esperado.

À Professora Dra. Maria Angélica Miglino, por toda paciência e compromisso, nunca me deixando desistir.

Aos funcionários do HC pelo acolhimento no laboratório.

Aos funcionários da FMVZ, Jaqueline, Maicon, Ronaldo, Índio e Dra. Rose Eli Grassi Rici, por toda ajuda sempre que precisei.

Aos amigos, Fernanda Faião, Arthur Cássio e Amilton Cesar, por fazerem dos meus dias mais alegres, por serem mais que colegas, e sim, grandes amigos.

Aos meus pais José Carlos e Sylvia Helena, por toda ajuda sempre, por toda paciência, abrigo e cuidados imensos com as crianças.

Ao meu irmão e cunhado, Leonardo e Rodrigo, por serem um exemplo de trabalho.

À minha sogra Doralice, meu sogro Rui e minha cunhada Lais, pelo apoio quando precisei.

Aos meus parentes: Nara, Tia Simone, Vini, Lais, Tia Kelly, Kitty e Tio Benê; por sempre acreditarem em mim.

E mais uma vez as minhas filhas, que tornaram a minha vida muito mais feliz!

Também agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada à todos de coração!

RESUMO

FERREIRA, A. O. **Análise das vias de administração e de biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial.** [Analysis of the different administration routes and biodistribution of the stem cells from liver bud of mice in the models of partial hepatectomy]. 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A perda do parênquima hepático, induzida por tratamento agudo, cirúrgico ou químico, desencadeia um processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada. A regeneração hepática, após a hepatectomia parcial de 70%, é um dos modelos mais adequados de regeneração de células, órgãos e tecidos mais estudados. No fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas, muitas das lesões são tão prejudiciais que este mecanismo de reparação é insuficiente, tornando o transplante a única opção. As células derivadas do broto hepático de ratos apresentam uma boa alternativa para tratamento de doenças hepáticas devido ao seu alto índice proliferativo e da expressão de marcadores de pluripotência, sendo sua aplicabilidade viável em modelos experimentais. O objetivo deste trabalho foi analisar as diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação visando a melhor regeneração do órgão. Foram realizados experimentos de hepatectomia parcial de 70% (N=50 animais), PET Scan MSFX PRO In-Vivo RX e fluorescência, índice hepatossomático, análise de marcadores solúveis (GH, AFP, CEA, IGF-1), análises hematológicas, microscopia de luz (coloração HE, Tricômio de Masson), análise de marcadores por citometria de fluxo (CD90, STRO-1, Nanog, Oct3/4, Ki-67, Caspase 3) e ciclo celular por citometria de fluxo. Nossos dados demonstraram que as células do broto hepático administradas na via endotraqueal apresentaram melhor equilíbrio entre proliferação e morte celular, com maior expressão dos marcadores de pluripotência, melhor organização celular e regeneração tecidual, em contraste com outras vias, incluindo endovenosa, intraperitoneal e oroenteral. Isto a torna mais segura e de maior viabilidade na regeneração celular em relação às demais vias, sendo mais eficiente nos modelos de hepatectomia parcial.

Palavras-chave: Célula derivada do broto hepático. Hepatectomia parcial. PET Scan. Regeneração hepática. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

FERREIRA, A. O. Analysis of the different administration routes and biodistribution of the stem cells from liver bud of mice in the models of partial hepatectomy. [Análise das vias de administração e de biodistribuição de células derivadas do broto hepático de ratos em modelos de hepatectomia parcial]. 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The restoration of liver parenchyma after partial hepatectomy or chemical treatments represents appropriate models to study regeneration mechanisms. The most appropriate model for liver regeneration is partial hepatectomy of 70%, however, organ repair properties are insufficient, suggesting the transplantation the best alternative to treat liver diseases. Cells derived from liver buds of rats show a high proliferative index and the expression of pluripotency markers; thus their significance for regeneration purposes can be tested experimentally. We here investigated different routes to administer cells derived from rat live buds of 12.5 days of gestation to adult individuals (N=50 animals) suffering from partial hepatectomy (70%). Applied methods included PET Scan MSFX PRO In-Vivo RX, fluorescence hepatossomatic index, analysis of soluble markers (GH, AFP, CEA, IGF-1), hematological analysis, light microscopy (staining HE, and Masson trichrome) as well as flow cytometry for cell cycle analysis and CD90, STRO-1, Nanog, OCT3/4, Ki-67, Caspase 3 expression. Our data showed that administration via the tracheal route resulted as favorite in regard to the balance between proliferation and cell deaths, of pluripotency marker expression, cellular organization and tissue regeneration, in contrast to other routes including: intravenous, intraperitoneal and oroenteral. Consequently, the tracheal route showed safer and more efficient treatment to enhance cell regeneration after partial hepatectomy.

Keywords: Cell derived hepatic bud. Flow cytometry. Liver regeneration. Partial hepatectomy. PET scans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental mostrando as diferentes vias de administração e as análises realizadas 27

Figura 2 - Delineamento experimental evidenciando desde a coleta das células derivadas do broto hepático com 12,5 dias de gestação, procedimento de hepatectomia parcial, e as vias de administração das células: endovenosa, intraperitoneal, traqueal e oroenteral 29

Figura 3 - Imagem de bioluminescência de rato nas diferentes vias de administração, evidenciando suas marcações fluorescentes nos órgãos correspondentes, (C) coração, (P) pulmão, (I) intestinos e (F) fígado 31

Figura 4 - Gráfico de linhas representando os valores de média de regeneração do fígado após 5, 10, 15 e 30 dias após a hepatectomia parcial, nas diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático 32

Figura 5 - Gráfico de barras demonstrando o índice hepatossomático do fígado em cada via de administração das células derivadas do broto hepático, após a hepatectomia parcial 33

Figura 6 - Fotomicrografia de fígados de ratos em diferentes vias de administração (ET) endotraqueal, (EV) endovenoso, (IP) intraperitoneal e (ORO) oroenteral, em 5 e 25 dias após a administração das células derivadas do broto hepático de ratos, coloração Hematoxilina/Eosina 34

Figura 7 - Fotomicrografia de fígados de ratos em diferentes vias de administração (ET) endotraqueal, (EV) endovenoso, (IP) intraperitoneal e (ORO) oroenteral, em 5 e 25 dias após a administração das células derivadas do broto hepático de ratos, coloração Tricromo de Masson 35

Figura 8 - Análises hematológicas dos animais, nas diferentes vias de administração de células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados após a hepatectomia de 70%, sendo (A) eritrócitos, (B) leucócitos, (C) plaquetas 37

Figura 9 - Análises bioquímicas de marcadores solúveis do rato SD em diferentes vias de administração, após o procedimento de hepatectomia, sendo (A) AFP, (B) CEA, (C) GH e (D) IGF-1 38

Figura 10 - Análise de marcadores mesenquimais no fígado de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráficos dot plot e gráficos de barras

evidenciando os resultados da expressão dos marcadores (A) CD90. (B) Oct ¾. (C) Stro1. (D) Nanog. (***p<0.05) 40
Figura 11 - Análise de marcadores de proliferação celular Ki-67 no fígado de ratos, após a hepatectomia , apresentando gráfico dot plot e gráfico de barras evidenciando os resultados da expressão (***p<0.05) 42
Figura 12 - Análise de morte celular - Caspase 3, apresentando gráfico dot plot e gráfico de barras evidenciando os resultados da expressão de apoptose (***p<0.05) 43
Figura 13 - Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo no fígado de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráfico de barras representando as médias e desvio padrão das diferentes fases do ciclo celular, nos diferentes períodos de 5, 15 e 25 dias. Nas vias (A) intraperitoneal, (B) oroenteral, (C) endovenosa e (D) endotraqueal . Valores de (***p<0.05) foram obtidos pelo teste de variância OneWay ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer 45
Figura 14 - Fluxograma esquemático dos principais efeitos observados nas diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos com 12.5 dias de gestação 50

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO GERAL** 14

2 **CAPÍTULO 1: ANÁLISE DAS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO BROTO HEPÁTICO DE RATOS NOS MODELOS DE HEPATECTOMIA PARCIAL** 20

2.1 INTRODUÇÃO 20

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS 22

2.2.1 Hepatectomia Parcial 23

2.2.2 Vias de Administração das Células Tronco 23

2.2.3 Protocolo de Bioluminescência 24

2.2.4 Índice Hepatossomático 24

2.2.5 Microscopia de Luz 25

2.2.6 Parâmetros Hematológicos 25

2.2.7 Análise Bioquímica de Marcadores Solúveis 25

2.2.8 Análise da Expressão Celular por Citometria de Fluxo 26

2.2.9 Ciclo Celular por Citometria de Fluxo 26

2.2.10 Análise Estatística 28

2.3 RESULTADOS 28

2.3.1 Hepatectomia Parcial 28

2.3.2 Aquisição das Imagens de Bioluminescência *in vivo* 30

2.3.3 Microscopia de Luz 33

2.3.4 Parâmetros Hematológicos 36

2.3.5 Análise Quantitativa de Marcadores Solúveis 38

2.3.6 Análise de Marcadores Mesenquimais por Citometria de Fluxo 39

2.3.7 Análise de Proliferação Celular por Citometria de Fluxo 41

2.3.8 Análise de Morte Celular por Citometria de Fluxo 42

2.3.9 Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo 44

2.4 DISCUSSÃO 46

3 **CONSIDERAÇÕES FINAIS** 52

REFERÊNCIAS 54

ANEXO 60

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo de anos de pesquisa, numerosos tipos de células-tronco foram identificadas. Cada célula apresenta com uma lista única de indicações e capacidades, mas as desvantagens têm sido o principal fator de condução para determinar a frequência de sua utilização. Como uma entidade ampla, as células-tronco são definidas como células indiferenciadas clonogênicas, as quais podem não só se auto-renovar indefinidamente, mas também podem se diferenciar em uma variedade de células lineares. Essas propriedades têm levantado curiosidade dentro a comunidade médica e as células tronco têm sido anunciadas como o futuro da medicina personalizada e seguro biológico para os seres humanos (ALMEIDA-PORADA; ZANJANI; PORADA, 2010).

Doenças hepáticas terminais frequentemente requerem o transplante de fígado. A terapia celular pode ser uma alternativa (MANZINI, 2015). O transplante de hepatócitos é uma terapia promissora para insuficiência hepática aguda. A terapia celular utilizando xenotransplante, surgiu como uma alternativa de tratamento para pacientes com falência de órgãos, devido à escassez de órgãos humanos para transplante (HAM et al., 2015).

Tem havido um enorme progresso feito no entendimento da patogênese da fibrose hepática, que criou novas oportunidades para o tratamento desta condição. Evidência clínica de fibrose, estabeleceu que o fígado possui a capacidade de reabsorver o tecido da cicatriz, e terapias futuras serão baseadas, em parte, nessa percepção. Além disso, o paradigma de ativação das células estreladas hepáticas, fornece um modelo importante para a definição de alvos de terapia antifibrótica. Oportunidades não faltam para acelerar a aprovação de medicamentos, uma vez biomarcadores são melhorados e pontos finais dos ensaios clínicos são mais bem definidos. Em geral, há evidências de que a fibrose estimulante é uma consequência tratável de doença crônica do fígado, que irão ser passíveis de terapia mesmo quando a doença subjacente não for curada (FRIEDMAN et al., 2015).

Células tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) são capazes de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; c) são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular. Em essência, as células tronco são capazes de fazer “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permaneçam

indiferenciadas, repondo o pool de células tronco, ou, alternativamente, podem se diferenciar em células especializadas (ZAGO; COVAS, 2006).

O número limitado de doadores de fígado para transplantes e a ausência de proliferação em culturas de hepatócitos, são os maiores fatores limitantes para as terapias que envolvam transplante hepático e hepatocitário, respectivamente. Essas características inviabilizam a utilização desses tratamentos em grande escala. Em contrapartida, progenitores hepáticos são altamente expansíveis *in vitro* e *in vivo*. Essas células são capazes de extensiva proliferação e subsequente diferenciação em células do ducto biliar e hepatócitos (MALHI et al., 2002). Sendo assim, fígados fetais e embrionários oferecem uma importante fonte de progenitores hepáticos para aplicações clínicas.

É sabido que durante a gestação (5 semanas em humanos) o processo de hematopoiese migra temporariamente do saco vitelino para o fígado fetal (MIGLIACCIO et al., 1986), sendo o principal sítio de hematopoiese no feto até o desenvolvimento da medula óssea. Diante desse fato, fica evidente a importância do estudo do fígado embrionário, não só para a Terapia Celular de doenças de órgãos oriundos do endoderma, mas também advindas de tecidos hematopoiéticos (ALBERTS et al., 2008).

Estudos, utilizando hepatócitos primários suínos, têm sido realizados, visando o transplante para fígados de pacientes com falência hepática fulminante. Entretanto, a possibilidade de zoonoses e o uso de células xenogênicas para terapia humana têm limitações práticas. Outro obstáculo é que hepatócitos primários, derivados de fígado adulto, não têm a habilidade de proliferar *in vitro* (PARK; LEE, 2005). Contudo, células tronco embrionárias proliferam indefinidamente *in vitro,* mantendo seu potencial de diferenciação para quase todos os tipo celulares, sendo essencial o estabelecimento de métodos para proliferação de células-tronco hepáticas como uma fonte bipotencial para diferenciação de hepatócitos e células do ducto biliar *in vitro* (THOMSON et al., 1998). Essas linhagens, além de promover possíveis tratamentos para doenças hepáticas, também têm importância nas pesquisas *in vitro* na elaboração de novos medicamentos, visto que o fígado é o principal órgão de desintoxicação do corpo (POUTON; HAYNES, 2005).

O desenvolvimento embrionário dos vertebrados tem sido estudado por muito tempo, e durante as últimas duas décadas um enorme progresso foi obtido, no estudo da definição das linhagens celulares, do potencial do desenvolvimento celular em embriões jovens e na compreensão de mecanismos moleculares que regulam a modelagem e diferenciação celular. O desenvolvimento embrionário no camundongo leva de 18 a 21 dias (PASSOS, 2010).

O broto hepático (divertículo hepático) surge na parte caudal do intestino anterior e cresce no mesoderma do septo transverso. Esse mesoderma forma o tecido conjuntivo do fígado, o tendão central do diafragma e o mesentério ventral do intestino, que o próprio fígado separa em duas partes: omento menor, que se estende do fígado ao esôfago inferior, estômago e duodeno superior, e o ligamento falciforme, que se estende do fígado até a parede ventral do corpo, e que abriga a veia umbilical em sua borda livre (caudal). Essa associação próxima do fígado ao septo transverso está evidenciada pelo fato de o tendão central do diafragma permanecer ligado diretamente ao fígado, na região chamada não revestida do fígado (o restante do fígado é coberto pelo peritônio visceral). A porção proximal do broto hepático forma o ducto biliar e também dá origem a outro broto do qual se formam o ducto cístico e a vesícula biliar. Durante a vida fetal (da 10 semana ao 7 mês), o fígado atua como o principal órgão hematopoiético até que sejam estabelecidos os recursos da medula óssea (BANKS, 1994).

O broto hepático dos embriões de ratos com 12,5 dias de gestação, apresentam se no início do desenvolvimento, neste período é possível observar dois segmentos, precursores do fígado adulto, constituído por células tronco e hepatoblastos estas células são capazes de proliferarem facilmente e subsequente se diferenciando em células do ducto biliar e hepatócitos (LUNA et al., 2013). Com 14,5 dias de gestação, o broto hepático apresenta quatro lobos hepáticos distintos, constituídos por hepatoblastos e hepatócitos, assumindo função hematopoiética até a formação da medula óssea (MOORE et al., 2008). Entre 9,5 e 15,5 dias de gestação, o broto hepático sofre um intenso crescimento, tornando-se o principal órgão responsável pela hematopoiese (BORT et al., 2006).

Nos fetos de 15,5 dias e 16,5 dias, há um aumento de volume do broto hepático, que já possuem um aspecto morfológico semelhante a um fígado maduro, embora histologicamente, não possua ainda tais características. A maturação final do fígado bem como a formação dos canais biliares extra hepáticos é gradual e contínua, se estende até após o nascimento (ZORN, 2008).

Os brotos hepáticos de 12,5-14,5 dias apresentaram-se como aglomerados de hepatoblastos, ainda desorganizados e circundados por inúmeras células precursoras sanguíneas nucleadas. Observou-se que os hepatoblastos possuem um núcleo grande basofílico com pouco citoplasma. Sinusóides com eritroblastos e células de Kupffer também foram encontrados. Com 14,5 dias, foi observada a coexistência de hepatoblastos e hepatócitos, além de megacariócitos. Nos fetos com 15,5 dias, começou a verificar-se distinção entre os cordões de hepatócitos em formação, limitado pelos capilares sinusóides.

Tais cordões começavam a confluir para as veias centrolobulares. Com 16,5 dias, a arquitetura parenquimal estava mais próxima da encontrada em fígados adultos, sendo a quantidade de hepatócitos superior à de hepatoblastos. Nesse prazo gestacional, o fígado ainda tinha função hematopoiética (LUNA et al., 2013).

Curiosamente, o intestino anterior, em toda a sua extensão, é capaz de formar tecido hepático, mas esse potencial é inibido por fatores secretados que provêm de tecidos vizinhos, inclusive do notocórdio e do mesoderma não cardíaco. Entretanto, na região do intestino anterior, formadora do fígado, a ação inibitória desses fatores é contrabalançada pelos FGFs, secretados pelo mesoderma cardíaco adjacente (dois negativos formam um positivo). O efeito final é o aumento da expressão dos fatores de transcrição nuclear HNF3 e HNF4 pelo hepatócito, que induz as células do endoderma a se diferenciarem em tecido hepático (SADLER et al., 2007).

Dentre os fatores envolvidos na regulação do desenvolvimento hepático encontram-se HNF1α eβ; HNF3, HNF4α e HNF6 e cited 2. O cited 2 evidencia a região a qual se dá origem ao fígado maduro e possui atuação como co-ativador de HNF4α. Outro fator de crescimento HGF, também está envolvido na hepatogênese, atuando na manutenção dos hepatócitos a partir da metade da hepatogênese (QU et al., 2007). As células diferenciadas em hepatócitos expressam albumina, AFP e CK18 e glicogênio. E as células do ducto biliar expressam GGT e CK19. No entanto, o fígado embrionário não possui muitas funções hepáticas de um vertebrado adulto, que o torna o centro metabólico do organismo, sendo estas adquiridas durante os estágios peri e pós-natal (PASSOS, 2010).

A publicação de Higgins e Anderson, em 1931, foi um marco e conseguiu transformar a lenda de Prometeu em objeto de estudo experimental. Os autores realizaram hepatectomia de 67% em ratos e conseguiam provar a ocorrência da regeneração hepática. Após este estudo, outros, avaliando a regeneração hepática, foram desenvolvidos. Em especial, o estudo de Stocker, Wullstein e Brau (1973) validaram o mito de Prometeu. Os autores realizaram, em ratos, 12 hepatectomias parciais consecutivas nos mesmos ratos e comprovaram a ocorrência da regeneração hepática após cada uma delas.

As hepatectomias parciais são procedimentos cirúrgicos de grande porte, muitas vezes necessários para tratamento de neoplasias hepáticas benignas ou malignas, e que podem acarretar índices relativamente elevados de morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2013).

A hepatectomia a 70% é o estímulo mais comumente usado para estudar a regeneração hepática, porque tem a vantagem de induzir o processo regenerativo sem causar dano ao tecido hepático remanescente. É diferente de outros processos causados por agente

hepatotóxicos ou virais, câncer ou cirrose, que estão associados a lesões e inflamação tecidual que reduzem a capacidade regenerativa dos hepatócitos. Além disso, com a hepatectomia parcial o início do estímulo regenerativo pode ser precisamente definido (TARLÁ et al., 2006; MICHALOPOULOS, 2014).

O processo de regeneração é dividido em três fases. Compreende-se como estágio inicial quando os hepatócitos adquirem a capacidade de replicação. Segue-se a fase de proliferação, período no qual o número de células hepáticas aumenta, buscando uma quantidade adequada para a restituição da função. Finalmente ocorre o estágio de terminação, período em que a divisão celular é encerrada, após atingir o volume de células necessárias para restituição da função. A proliferação dos hepatócitos inicia-se na região periportal (zona 1) depois de um intervalo de 24 horas e continua na região pericentral (zona 3) durante 36 a 48 horas. Após três dias, a histologia do fígado é caracterizada por grupos de hepatócitos com vascularização rudimentar. A invasão destes aglomerados por vasos sanguíneos similares a sinusóides ocorre no segundo dia a partir do estímulo regenerativo. Em sete dias uma estrutura lobular típica do fígado está restaurada, mas com lóbulos aumentados de volume, os quais serão remodelados para o tamanho normal (PAES-BARBOSA, 2010).

Levando em consideração o processo de regeneração do fígado, posteriormente a cirurgia de hepatectomia e a eficácia terapêutica utilizando das células precursoras hepáticas no tratamento de doenças hepatocelulares, se faz necessário um estudo aprofundado para responder qual seria o melhor período embrionário para extrair essas células e qual a melhor via de administração e biodistribuição, no tecido lesionado.

O objetivo deste trabalho é caracterizar qual a melhor via de administração das células derivadas do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação, no modelo de hepatectomia parcial de 70%, visando a regeneração e organização tecidual.

Capítulo 1

2 CAPÍTULO 1: ANÁLISE DAS VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DO BROTO HEPÁTICO DE RATOS NOS MODELOS DE HEPATECTOMIA PARCIAL

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar as diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação visando a melhor regeneração do órgão. Foram realizados experimentos de hepatectomia parcial de 70%, PET Scan MSFX PRO In-Vivo RX e fluorescência, índice hepatossomático, análise de marcadores solúveis (GH, AFP, CEA, IGF-1), análises hematológicas, microscopia de luz (coloração HE, Tricômio de Masson e Picrossírius), análise de marcadores por citometria de fluxo (CD90, STRO-1, Nanog, Oct3/4, Ki-67, Caspase 3) e ciclo celular por citometria de fluxo. Nossos dados demonstraram que as células do broto hepático administradas na via endotraqueal apresentaram melhor equilíbrio entre proliferação e morte celular, com maior expressão dos marcadores de pluripotência, melhor organização celular e regeneração tecidual. Isto a torna mais segura e de maior viabilidade na regeneração celular em relação às demais vias, sendo mais eficiente nos modelos de hepatectomia parcial. As células do broto hepático administradas na via endotraqueal apresentaram melhor equilíbrio entre proliferação e morte celular, com maior expressão dos marcadores de pluripotência, com apresentação de melhor organização celular e regeneração tecidual, tornando-se assim a melhor opção para o modelo de regeneração hepática aqui estudada.

Palavras-chave: Célula derivada do broto hepático. Hepatectomia parcial. PET Scan. Regeneração hepática e citometria de fluxo.

2.1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira dos Transplantados de Fígado e Portadores de Doenças Hepáticas (2015), atualmente, mais de 6200 pessoas aguardam por um transplante de fígado no Brasil, sendo que apenas 1000 transplantes são realizados anualmente. Em termos

gerais, o fígado é o segundo órgão mais transplantado, perdendo apenas para o rim, o que mostra o quão comum e quão sério é a doença hepática em estágio final no Brasil.

Nas últimas cinco décadas, as doenças hepáticas têm sido cada vez mais prevalentes e muitas vezes exigem intervenção médica considerável. No entanto, as opções de tratamento atuais têm demonstrado problemas graves, sendo necessárias investigações para fornecer alternativas adequadas. Estes tratamentos são dificilmente disponíveis, muito caros e apresentam um custo elevado para a qualidade de vida do paciente. A introdução da terapia regenerativa com células-tronco em doenças do fígado tem sido anunciada como o futuro da medicina personalizada e pode ser a alternativa que o sistema de saúde procura (IRFAN; AHMED, 2014).

As doenças envolvendo órgãos derivados do endoderma, particularmente o fígado, afetam milhares de pessoas no mundo. No fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas, muitas das lesões são tão prejudiciais que este mecanismo de reparação é insuficiente, tornando o transplante a única opção (MURACA; GERUNDA NERI, 2002; SELDEN; HODGSON, 2004; MURACA, 2008). Outra via de tratamento para os pacientes de doenças hepáticas é estimular a regeneração do tecido *in vivo* ou gerar tecido de substituição *in vitro* (PASSOS, 2010).

Células progenitoras hepáticas (HPC) são encontradas naturalmente e especificamente no fígado. No entanto, o mecanismo de ação não está totalmente compreendido, mas tem sido provado que a população de células aumenta proporcionalmente à gravidade da progressão da doença. Uma vez que estas células podem ser derivadas a partir do sangue de cordão umbilical humano, a sua transplantação tem sido sugerida como uma opção de tratamento para neutralizar a insuficiência hepática. Entretanto, a replicação de HPC em excesso pode levar a carcinoma hepatocelular, tornando seu uso antiético. O argumento apresentado contra este caso é que, em lesão hepática grave, a população natural HPC é insuficiente para permitir regeneração e, consequentemente, a infusão destas células pode permitir um maior grau de regeneração (IRFAN; AHMED, 2014).

Experimentos com células-tronco têm sido realizados para tratar doenças em órgãos mesodermicamente derivados como o sistema hematopoiético. O sucesso destes tratamentos gera ótimas perspectivas para a terapia celular em doenças de órgãos oriundos da endoderme (SPENCE; WELLS, 2007). As células derivadas do broto hepático de ratos, com 12,5 dias de gestação, apresentaram uma boa alternativa para tratamento de doenças hepáticas devido ao seu alto índice proliferativo e da expressão de marcadores de pluripotência. Sendo assim, sua aplicabilidade é viável em modelos experimentais (OLIVOTTI, 2011) (AnexoA).

A regeneração hepática representa um mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcional, seja por injúria química, viral, perda traumática ou por hepatectomia parcial (ASSI MINUK, 1997; GREEN; KROEMER, 1998). Reconhece-se que a regeneração hepática é um evento que promove crescimento tecidual altamente organizado e ordenado. A perda do parênquima hepático, induzida por tratamento agudo, cirúrgico ou químico, desencadeia um processo regenerativo até que a massa hepática seja completamente restaurada. A restauração ocorre por hiperplasia celular compensatória do parênquima remanescente, de forma regulada e precisa, até o fígado atingir seu peso original, com pequena variação de 5 a 10% (RAMALHO et al., 1993; LABRECQUE, 1994; OKANO, 1997; SANCHES et al., 2014). A maior parte do conhecimento atual sobre a regeneração hepática é proveniente de estudos realizados em ratos submetidos à hepatectomia parcial de 70%. A hepatectomia parcial em ratos (HIGGINS; ANDERSON, 1931) é um modelo clássico para avaliação da regeneração tecidual, englobando todos os eventos do ciclo celular. A hepatectomia parcial é seguida por aumento de volume dos seguimentos hepáticos remanescentes, porém não pela restituição da anatomia original (PAES-BARBOSA et al., 2011).

A regeneração hepática, após a hepatectomia parcial de 70%, é um dos modelos de regeneração de células, órgãos e tecidos mais estudados. A complexidade das reações que sinalizam o início e o término deste processo tem fornecido paradigmas para a medicina regenerativa. Muitos aspectos dos mecanismos de sinalização, envolvidos na regeneração hepática, estão sobre investigação (MENDES-BRAZ et al., 2014).

São diversas as vias de administração para pesquisas com células, tais como as vias intraperitoneal, endovenosa, endotraqueal e oroenteral. Esse estudo tem como finalidade descobrir se há uma melhor via de administração das células derivadas do broto hepático de ratos para utilização no modelo de hepatectomia parcial, por meio da análise de expressão de marcadores bioquímicos e funcionais.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas dos materiais e métodos utilizados serão descritos abaixo:

2.2.1 Hepatectomia Parcial

Os animais foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia de hepatectomia parcial de (70%) (NACIF et al., 2015) e foram divididos em quatro diferentes grupos de vias de administração: via endovenosa (n = 10); através da administração das células tronco do broto hepático de ratos na veia dorsal do pênis de ratos SD; via intraperitoneal (n = 10) por meio de administração das células tronco do broto hepático de ratos na cavidade abdominal; via oroenteral (n = 10) realizada com a colocação de sonda uretral número 4, mantida na terceira porção duodenal, onde se aplicou as células tronco do broto hepático de ratos; via traqueal (n = 10) em que administram-se as células tronco do broto hepático de ratos seguida à intubação traqueal e mais (n=10) do grupo controle. Os animais foram monitorados durante 30 dias, e avaliados a cada 7 dias no PET-scan. Todos os procedimentos foram realizados com anestesia intraperitoneal com cloridrato de cetamina 5% (30mg/Kg) (Ketalar®, Cristália) e xilazina. Os animais foram mantidos aquecidos com um 45W,127V lâmpada de halogéneo e a temperatura corporal monitorada usando um termômetro digital retal (YSI 4000A Precision Termômetro, EUA) e mantida entre 35 ° C e 37 ° C.

2.2.2 Vias de Administração das Células Tronco

Neste experimento foram utilizados 50 ratos da linhagem SD. Os animais foram submetidos a cirurgias de hepatectomia de 70% para avaliação da migração celular através da utilização do aparelho MSFX PRO com sistema de imagens *In-Vivo* (PETscan) com o software Carestream Molecular Imaging versão 5.0.7.24 (Carestream, Woodbridge, CT, USA). Estas células-tronco do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação, foram transduzidas com vetor lentiviral GFP+ (na concentração de 500 microlitros de meio e adicionou-se na placa de cultura com o meio mínimo com polibreno, assim as células eram translúcidas com esse vírus e aplicadas após 48 horas em cultura) e administradas nos animais em uma concentração de 1x 10^4 de células no término de cada cirurgia. Para esta análise foram utilizados 10 animais para as quatro vias de administração diferentes: Oroenteral,

Endovenosa, Traqueal, Intraperitoneal e mais 10 animais para um grupo controle, os quais foram operados, porém sem administração das células tronco do broto hepático.

2.2.3 Protocolo de Bioluminescência

Imagens de raios-X dos animais foram adquiridas, utilizando-se um tempo de exposição de 240 segundos, um campo de 180 milímetros de vista e um f-stop de 2,80. Os raios-X foram adquiridos, utilizando-se um sistema de imagem de raios-X In-Vivo (Carestream) com software de imagem Carestream Molecular versão 5.0.7.24 (Carestream, Woodbridge, CT, EUA). As imagens foram reconstruídas usando o respectivo algoritmo 2-D ordenou máxima subconjuntos expectativa (OSEM). Nenhuma correção foi necessária para atenuação ou espalhamento. O scanner teve movimentos verticais e horizontais, controlados por computador com um campo axial eficaz de visão (FOV) de 7,8 cm e uma FOV transaxial de 10 cm. Os ratos foram colocados no centro do campo de vista a proporcionar uma maior resolução de PET- Scan e uma maior sensibilidade. As imagens foram obtidas com uma varredura 4 min utilizando parâmetros de digitalização de aquisição de imagem de rotina.

2.2.4 Índice Hepatossomático

Para esta análise, realizou-se cirurgia de hepatectomia parcial de 70% em 50 ratos da linhagem SD, sendo 3 animais de cada via de administração (Traqueal, Oroenteral, Endovenosa, Intraperitoneal e grupo controle). Esses animais foram sacrificados a cada período de suas respectivas coletas (5º dia, 10º dia e 30º dias após os protocolos cirúrgicos), mensurando o peso inicial/ final do animal comparado ao peso final do fígado, gerando assim um percentual de regeneração do órgão.

2.2.5 Microscopia de Luz

As amostras de fígado foram fragmentadas e colocadas em solução formol 10% em PBS (Dulbecco's phosphatate buffer saline-DPBS, Gibco Co., USA), permanecendo por 48 horas para fixação. Em seguida, o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast (Paraplast Embedding Media – Paraplast Plus, Oxford Lab., USA). Para esta análise utilizamos 3 colorações: HE (Hematoxilina e eosina), Tricômio de Masson e Picrossírius.

2.2.6 Parâmetros Hematológicos

A contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas é feita através do método direto de Neubauer, após a diluição da amostra em líquidos específicos e multiplicando o valor obtido pelos fatores correspondentes.

2.2.7 Análise Bioquímica de Marcadores Solúveis

As amostras de sangue foram coletadas no ato cirúrgico, e o soro obtido depois de 30 minutos de coagulação, por centrifugação a 2500g durante 15 min. Os soros foram removidos e usados de parâmetros bioquímicos e marcadores tumorais. Outros soros foram armazenados a -70°C até serem analisados para a determinação de todos os parâmetros, para se fazer realizado o teste de quimiluminescência para CEA (antígeno carcinoembrionário) , GH (hormônio de crescimento), AFP (alfafetoproteína) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) pelo analisador de imunoensaio LIAISON® (DiaSorin SpA (DiaSorin). O seu princípio do teste baseia-se na tecnologia de partículas magnéticas e quimioluminescência com uma cinética de luz de flash, utilizando um derivado de isoluminol como um rótulo. As amostras foram colocadas em prateleiras para 10 tubos cada. As amostras e os reagentes foram transferidos através de agulhas de pipetagem. Os volumes das amostras de ensaios testados variaram de 10 a 100 µl. Os níveis de líquido de amostras, reagentes, entradas e

líquido do sistema foram controlados através de sensores. Os reagentes são armazenados em uma zona de temperatura controlada que pode ser arrefecida e continuamente recarregada. Até 15 diferentes Integrais reagentes podem ser carregados a bordo e processado por selecionáveis modos de funcionamento. A redução de dados baseia-se em uma curva principal com um método de recalibração de dois pontos. O tempo necessário, a partir de aspiração da amostra de primeiro resultado, foi de 34 minutos para o CEA, AFP e 30 minutos para a GH e IGF-1. O método para a determinação quantitativa de CEA e AFP é um imunoensaio de quimiluminescência.

2.2.8 Análise da Expressão Celular por Citometria de Fluxo

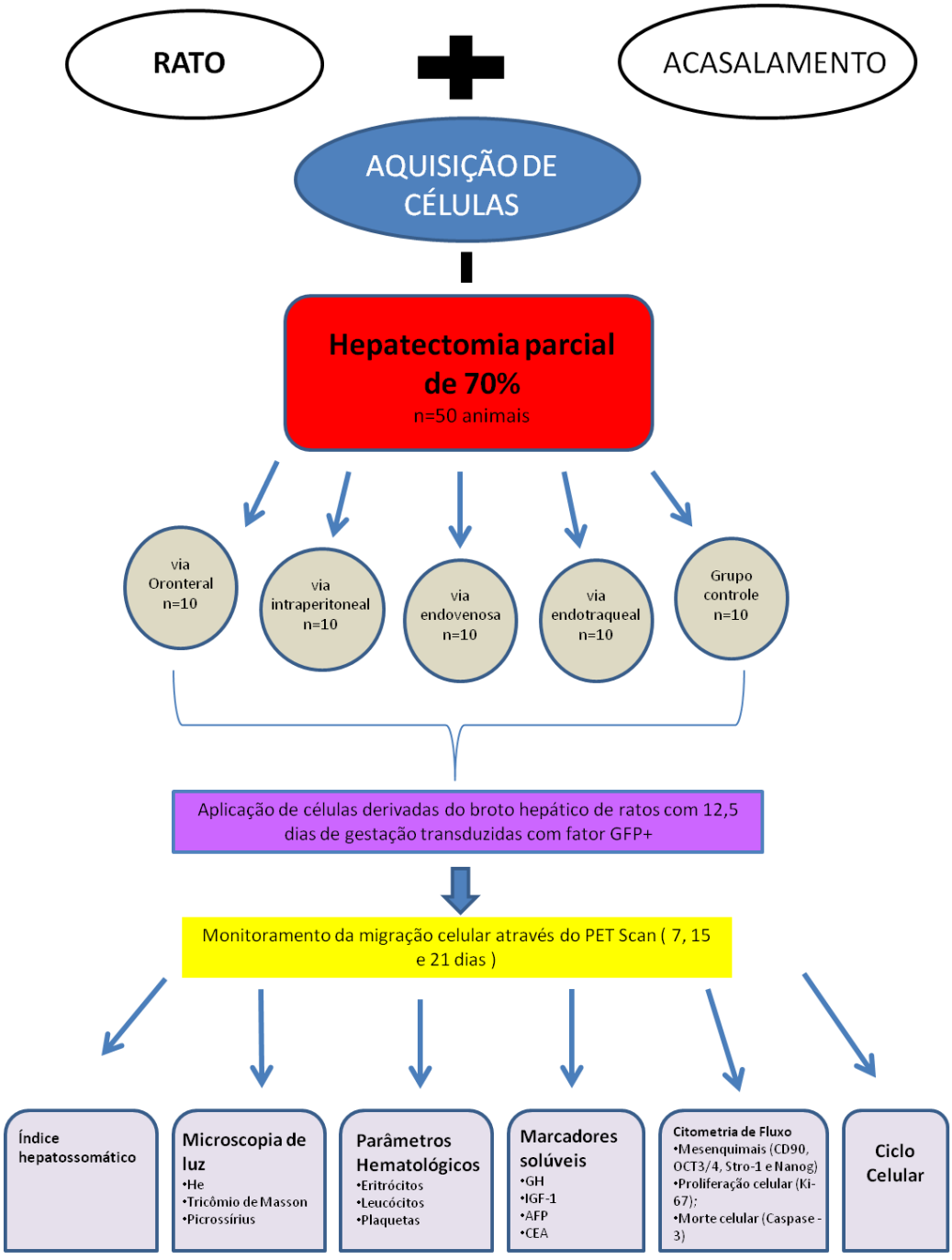
As amostras dos fígados foram maceradas, digeridas com colagenase tipo IV e filtradas para obtenção da suspensão das células. As mesmas foram ressuspendidas em Tampão FACS e separadas em tubos de citometria. Para os marcadores intracitoplasmáticos e nucleares as células foram permeabilizadas previamente com 5µl de Triton X-100 0,1% por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos: Ki67 (ab 15698, abcam), Caspase 3 (sc 7272 , Santa Cruz), Oct¾ (ab 18976, Abcam), Nanog (ab 80892, Abcam), CD90 (Rd 3467, R&D Syatems) e Stro-1 (sc 14679, Santa Cruz). Os tubos foram centrifugados e o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspendido em 100ul e adicionado 1ul de anticorpo secundário (*Fitc mouse anti IGg Goat*). A análise das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo (FACSCalibur), a expressão dos marcadores determinada pela comparação com um isotipo controle inespecífico.

2.2.9 Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

As suspensões celulares obtidas dos animais tratados foram maceradas, centrifugadas e ressuspendidas em álcool 70% e álcool RNAse (1µg/mL) respectivamente. O tubo foi centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e acrescentado o tampão FACs Flow, transportando a suspensão para tubos de citometria, acrescentando o anticorpo específico da diferenciação e maturação de células mesenquimais incubando por 15 minutos a 4oC. As amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10000 eventos onde foi

usado o programa CELLQUEST. A expressão de marcadores de membrana será determinada pela comparação com um isótopo controle analisada em histograma. A figura 1 ilustra o delineamento experimental.

Figura 1 - Delineamento experimental mostrando as diferentes vias de administração e as análises realizadas



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.2.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Variância ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de TUKEY-KRAMER. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

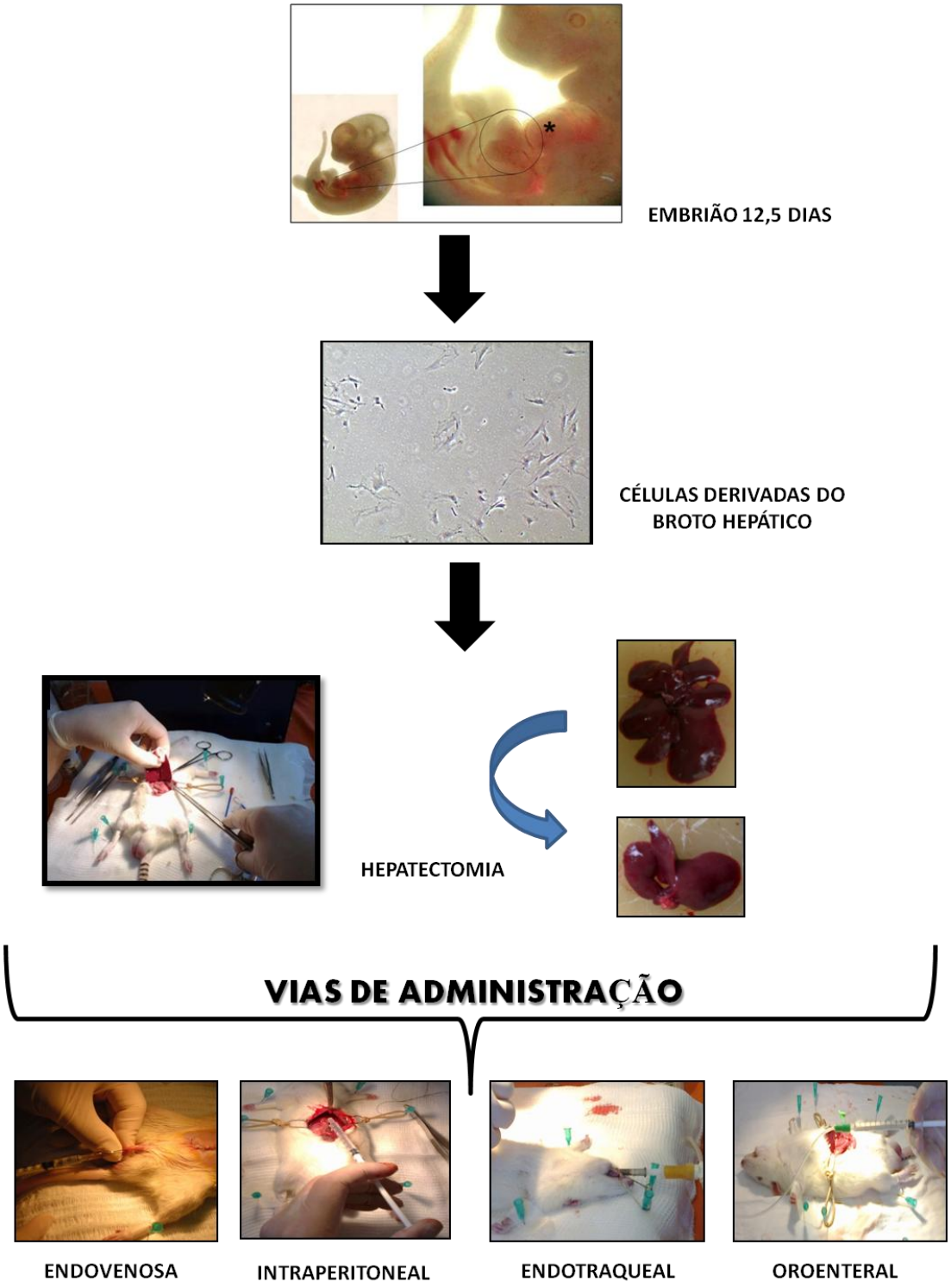
2.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram descritos de acordo com a metodologia aplicada.

2.3.1 Hepatectomia Parcial

Os animais passaram por procedimentos cirúrgicos de hepatectomia parcial de 70% do órgão, afim de se acompanhar a regeneração após a aplicação das células tronco do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação. O procedimento consistiu na retirada dos lobos hepáticos lateral esquerdo, lateral direito e quadrado, deixando apenas o lobo hepático medial esquerdo, medial direito e caudado, que correspondem a 30% do órgão. Após a laparotomia e isolamento do órgão, foi feita a ressecção e ligadura do lobo, mantendo-se apenas os lobos mencionados acima, o que corresponde a 30% do órgão original. O animal recebeu a aplicação das células derivadas do broto hepático de ratos com 12,5 dias de gestação transduzidas com o vetor lentiviral GFP+, através das seguintes vias de administração: oroenteral, traqueal, intraperitoneal e endovenosa (Figura 2).

Figura 2 - Delineamento experimental evidenciando desde a coleta das células derivadas do broto hepático com 12,5 dias de gestação, procedimento de hepatectomia parcial, e as vias de administração das células: endovenosa, intraperitoneal, traqueal e oroenteral

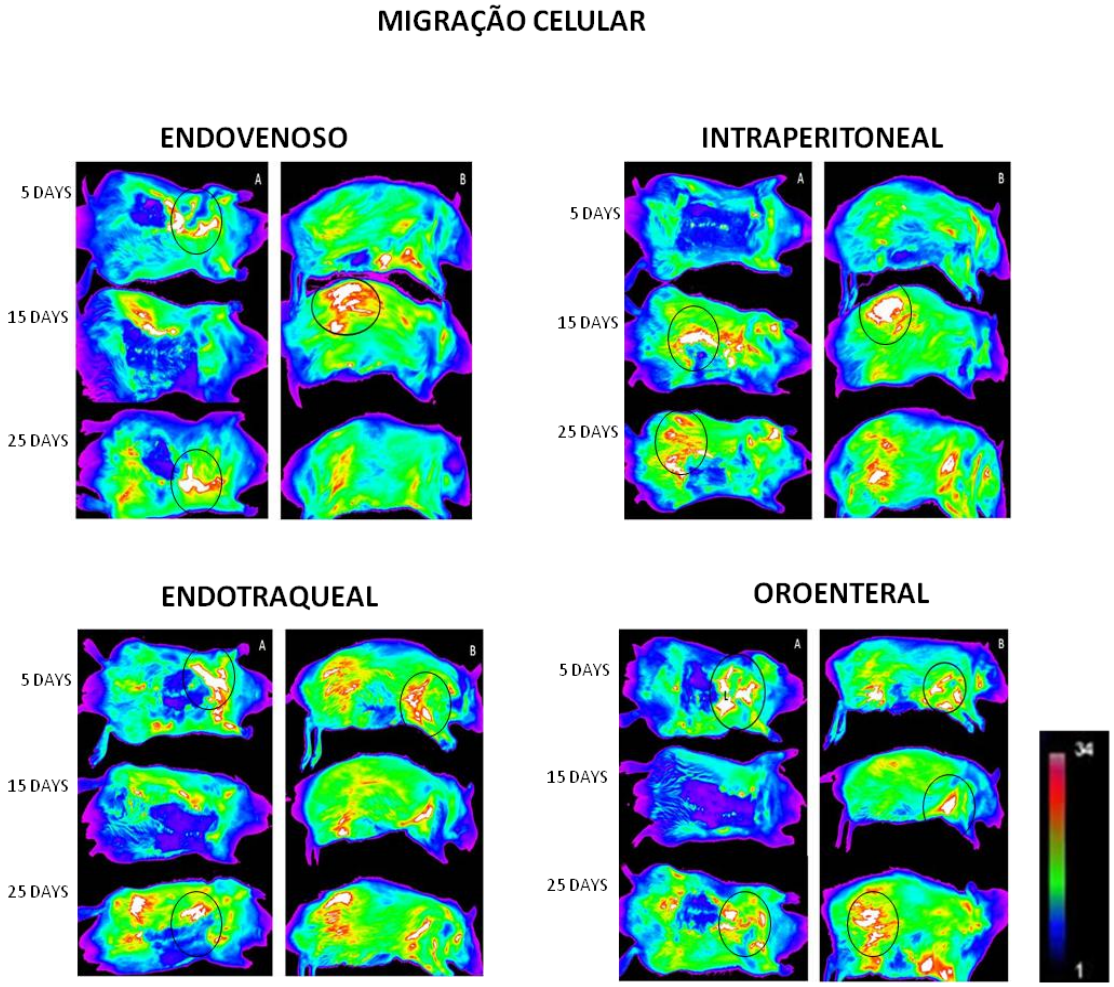


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.2 Aquisição das Imagens de Bioluminescência *in vivo*

Os animais foram sedados e posteriormente foram realizados o exame de RX mais a detecção da fluorescência, através do aparelho de RX MSFX PRO In-Vivo da Carestrean, onde foram observados a marcação de fluorescência. As imagens foram reconstruídas por um 2-dimensões ordenou-subconjuntos expectativa máxima (OSEM) algoritmo. Nenhuma correção foi necessária para a atenuação e dispersão. O scanner foi controlado pelo movimento vertical e horizontal com campo efetiva axial de visão (FOV) de 7,8cm e um transaxial (FOV) de 10 centímetros. Os ratos foram colocados no centro do campo de visão, onde ele tem melhor resolução de micro-PET e obteve maior sensibilidade, a imagem foi obtida através de um scan de 4 min utilizando aquisição de imagem parâmetro de rotina (CHOW et al., 2006). Para minimizar os efeitos de volume parcial, houve o cuidado de não incluir os limites de órgãos anatômicos. Nestas aplicações, as células-tronco do broto hepático de ratos transduzidas, foram administradas em uma concentração de 1 x 10^4 células diluídas em 1mL de solução fisiológica estéril. Via endovenosa - as células-tronco do broto hepático de ratos foram administradas na veia peniana, e observou-se que as células-tronco do broto hepático após 15 dias estava concentrada na região de pulmão, fígado, intestino e rim. Via intraperitoneal - observou-se uma grande marcação das células-tronco em rim e intestino no período de 7 a 21 dias. Via Traqueal - utilizou-se uma sonda traqueal número 1 que foi introduzida pela boca até a traquéia.Nesta aplicação observou-se uma grande concentração das células-tronco do broto hepático de 7 a 21 dias em região de pulmão. Via oroenteral - utilizou-se uma sonda gástrica número 2, a qual foi introduzida pela boca até o duodeno, onde se observou uma grande concentração de células-tronco do broto hepático na região de pulmão e fígado no período de 7 a 21 dias (Figura 3).

Figura 3 - Imagem de bioluminescência de rato nas diferentes vias de administração, evidenciando suas marcações fluorescentes nos órgãos correspondentes, (C) coração, (P) pulmão, (I) intestinos e (F) fígado



Identificação da distribuição das células do broto hepático de ratos com 12.5 dias de gestação em diferentes órgãos através do método de bioluminescência

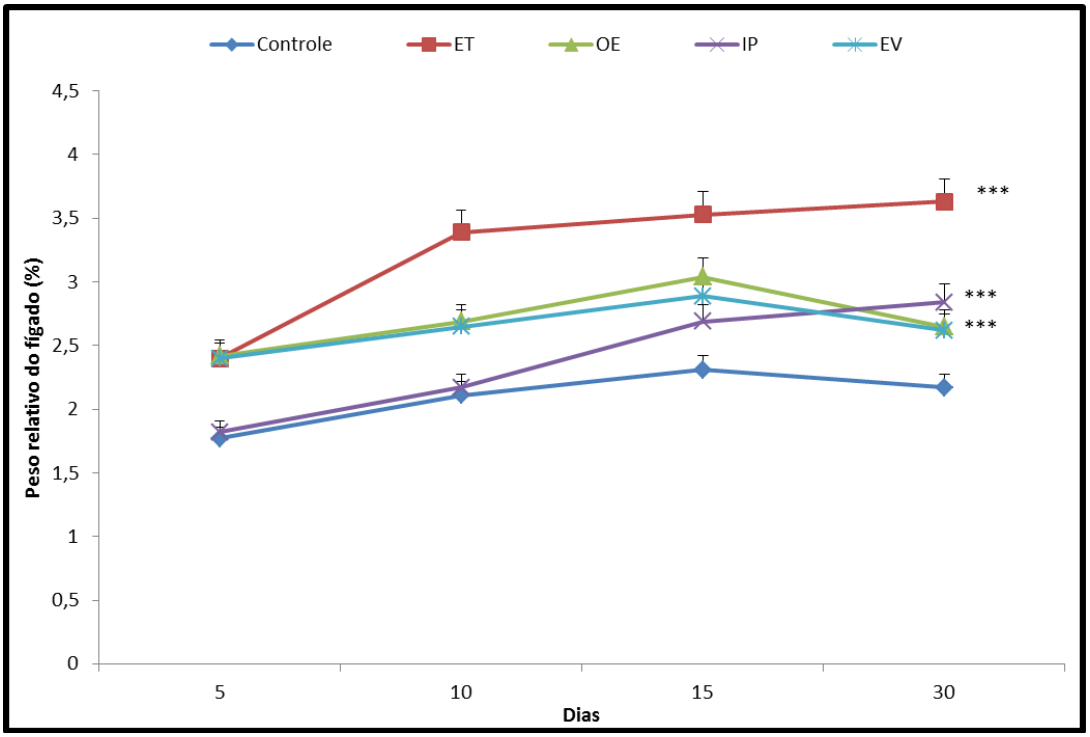
Vias de administração	5 dias	15 dias	25 dias
Oroenteral	C+F	P+F+I	F+I
Intraperitoneal	I	I	I
Endovenosa	I	C+F	C+F
Endotraqueal	P+I	P+I+F	P+I+F

* (C)coração, (F)fígado, (P)pulmão, (I)intestino

Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

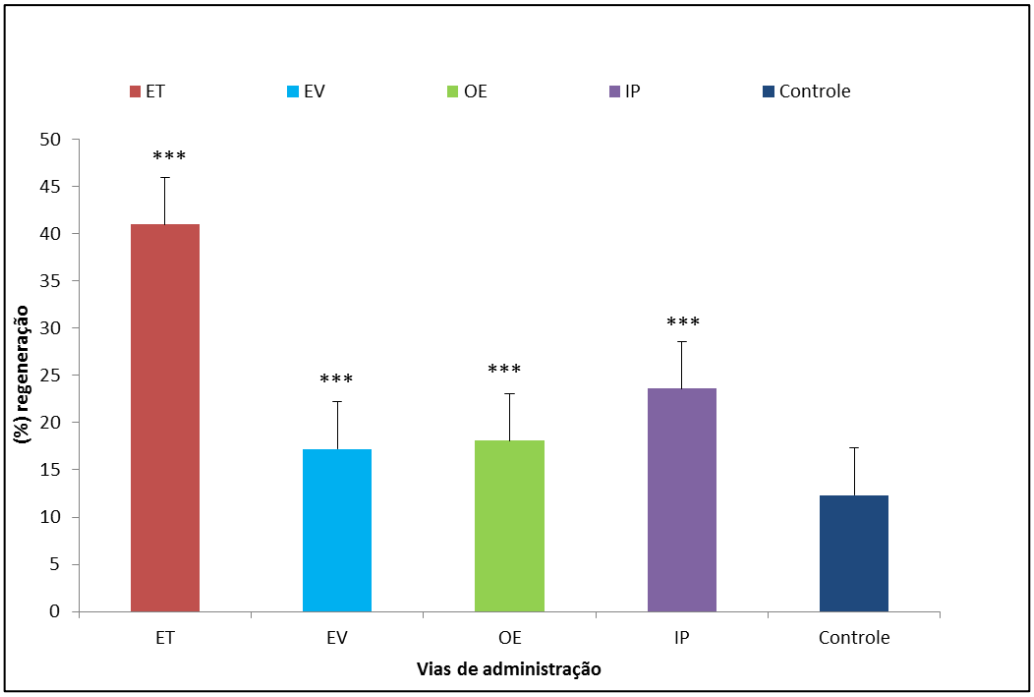
Na avaliação da regeneração relativa do órgão, observou-se, que na via traqueal obteve-se um maior percentual de regeneração em todos os períodos avaliados, diferentemente de todas as outras vias de administração. As vias oroenteral e endovenosa, apresentaram uma boa taxa de regeração no primeiro período de coleta de 5 dias, reduzindo um pouco no segundo após 10 dias e mantendo-se constante até o final das coletas. A via intraperitoneal foi a efetiva na distribuição e reparação, dentre as vias estudadas, seu nível de regeneração em muitas coletas igualou-se ao do grupo controle, mantendo-se nulo. A via traqueal apresentou um maior índice percentual de regeneração 41%, enquanto as outras vias como oroenteral apresentou um índice de 18,2%, a intraperitoneal 23,6 % e a endovenosa 17,2%. Ressaltando a grande diferença na via traqueal, que supera em dobro a via endovenosa (Figuras 4,5).

Figura 4 - Gráfico de linhas representando os valores de média de regeneração do fígado após 5, 10, 15 e 30 dias após a hepatectomia parcial, nas diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Figura 5 - Gráfico de barras demonstrando o índice hepatossomático do fígado em cada via de administração das células derivadas do broto hepático, após a hepatectomia parcial

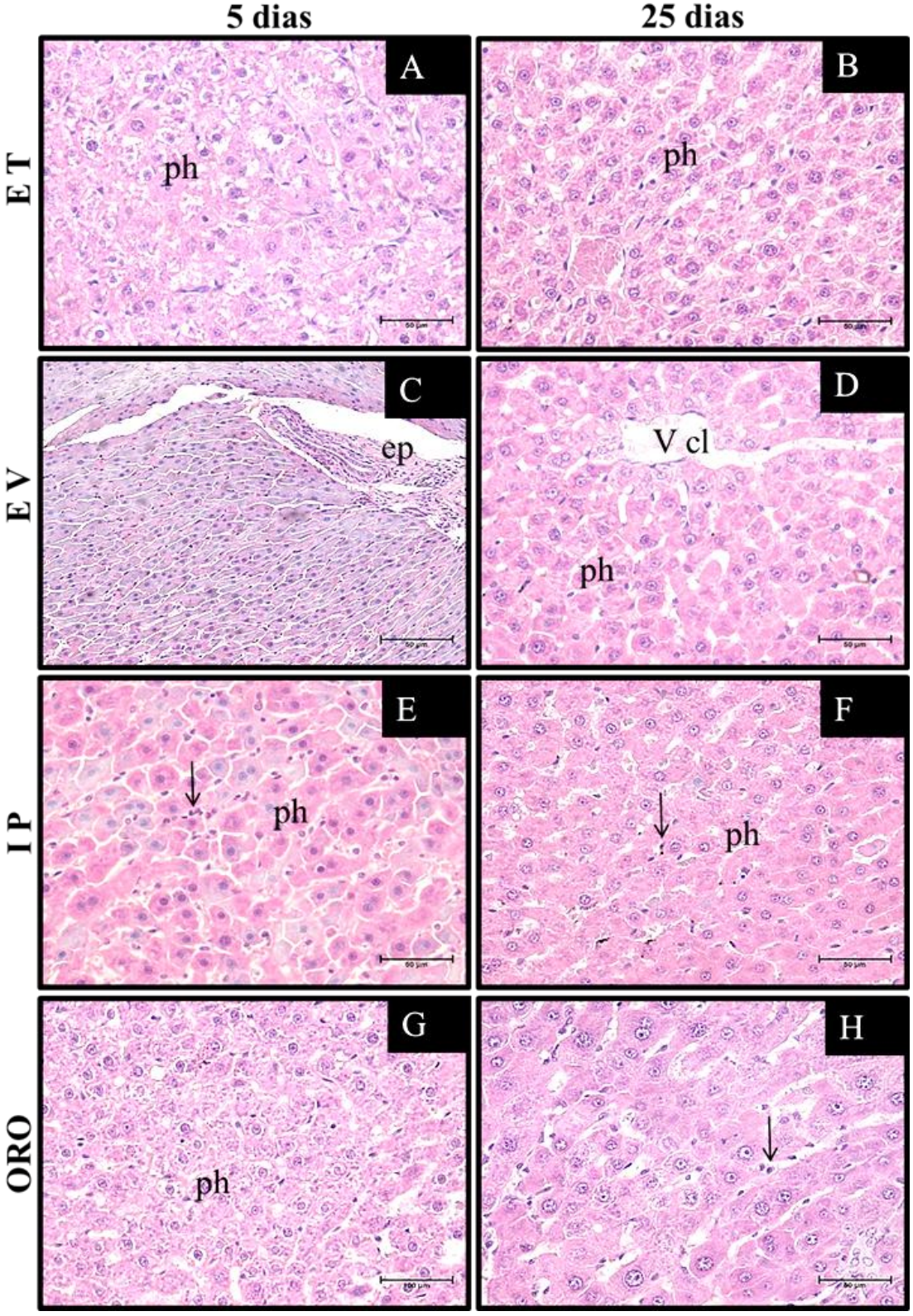


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.3 Microscopia de Luz

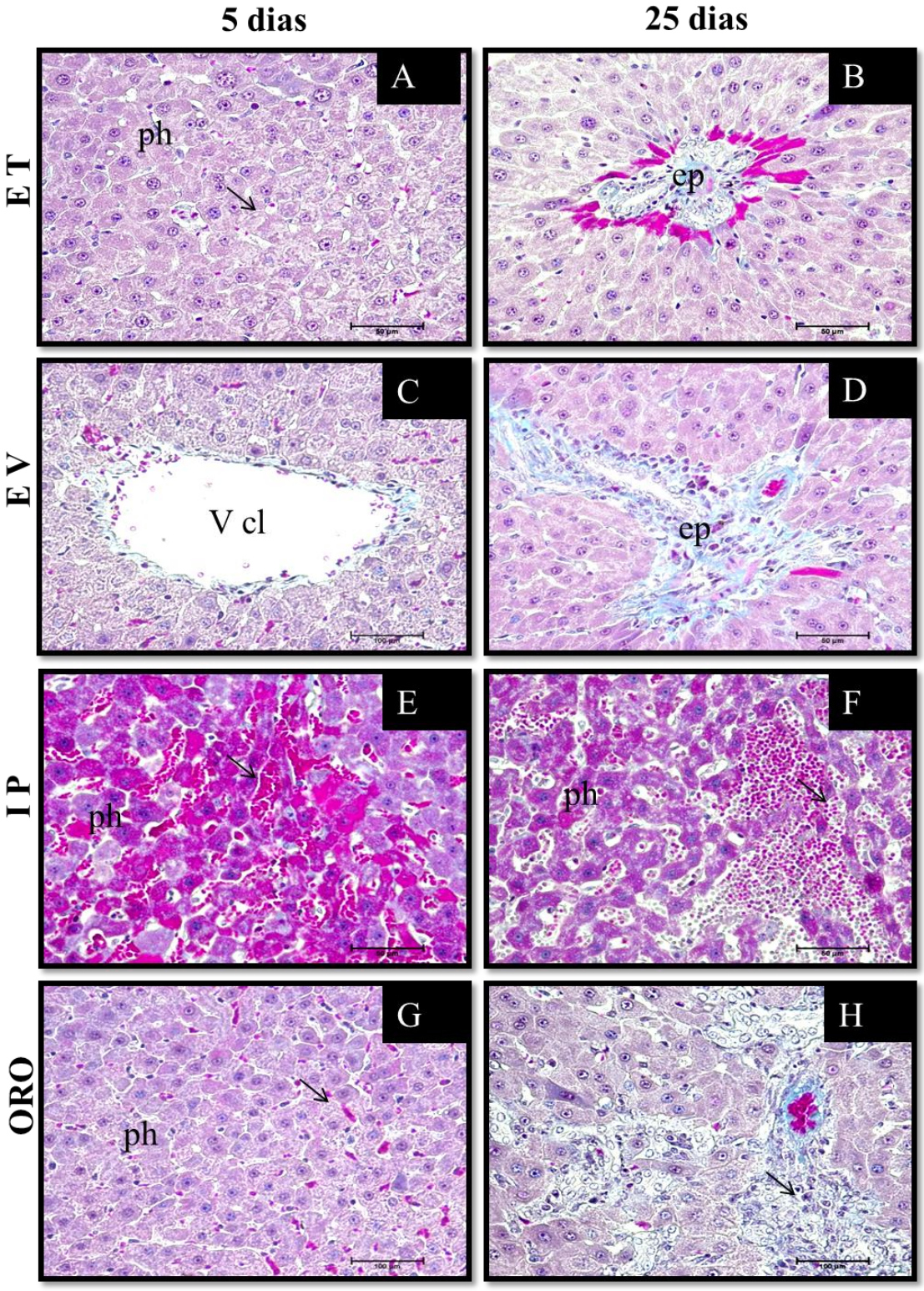
Nos achados da microscopia de luz, nas colorações Hematoxilina Eosina (HE) e de Tricômio de Masson, pode-se observar que no período de 5 dias após a hepatectomia, todos os tecidos das quatro vias estudadas estavam alterados, apresentando grande infiltração leucocitária, parênquima desordenado, sem formação de cordões de hepatócitos, células com núcleos disformes, apresentando um ou mais núcleos. Com 25 dias ainda se observa presença de infiltração leucocitária, principalmente nas vias intraperitoneais e oroenterais. Nas vias endovenosa e traqueal, já se nota uma melhora da organização tecidual, onde há pouca presença de tecido inflamatório. Na coloração de Picrossírius, com 5 dias nota-se grande infiltração leucocitária na via endovenosa, intraperitoneal e oroenteral. Com 25 dias o arranjo tecidual melhora, principalmente nas vias traqueal e endovenosa, na qual se observa o início de formação de cordões de hepatócitos (Figuras 6 e 7).

Figura 6- Fotomicrografia de fígados de ratos em diferentes vias de administração (ET) endotraqueal, (EV) endovenoso, (IP) intraperitoneal e (ORO) oroenteral, em 5 e 25 dias após a administração das células derivadas do broto hepático de ratos. A: (ph) parênquima hepático. B:parênquima hepático. C: (ep) espaço porta. D: (V cl) veia centro lobular; parênquima hepático. E: (ph) parênquima hepático; sinusóides (seta). F: (ph) parênquima hepático; sinusóides (seta). G: parênquima hepático desorganizado. H: parênquima hepático (ph) desorganizado; (setas); sinusóides. Hematoxilina/ Eosina



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Figura 7- Fotomicrografia de fígados de ratos em diferentes vias de administração (ET) endotraqueal, (EV) endovenoso, (IP) intraperitoneal e (ORO) oroenteral, em 5 e 25 dias após a administração das células derivadas do broto hepático de ratos. A: (ph) parênquima hepático; (seta) infiltrado leucocitário; B: espaço porta; C: (vcl) veias centrolobulares. D: (ep) espaço porta. E: (ph) parênquima hepático; (setas) mostrando a infiltração leucocitária. F-G-H: parênquima hepático (ph) desorganizado; (setas) mostrando a infiltração leucocitária. Tricromo de Masson



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.4 Parâmetros Hematológicos

Nos parâmetros hematológicos, o eritrograma, apresentou para a aplicação "via oroenteral" uma queda na concentração de eritrócitos com o passar dos dias sucessivamente. Para a "via endovenosa" e "intraperitoneal" houve uma queda significativa dos eritrócitos. Para a "via traqueal", a concentração de eritrócitos manteve-se na média, mostrando ser uma via segura e com menor efeito colateral (***). No leucograma observamos, que a via oroenteral apresenta um aumento no número de leucócitos com o passar dos dias após a cirurgia. Para as outras vias endovenosa, traqueal e intraperitoneal, evidenciam-se uma oscilação na concentração apresentada. Porém para a via traqueal a oscilação entre 5 e 25 dias foi menor que as outras, sendo mais segura em sua distribuição tecidual, tendo o maior período de retenção no tecido hepático (***). As plaquetas neste experimento apresentaram grandes variações quantitativas, contudo para a via intraperitoneal houve um aumento no decorrer do período estudado, tornando-se a melhor, pois houve uma resposta do organismo evidenciando o seu potencial regenerativo, decorrente da perda do tecido hepático pelo procedimento cirúrgico (***) (Figura 8).

Figura 8 - Tabelas das análises hematológicas dos animais, nas diferentes vias de administração de células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados após a hepatectomia parcial sendo (A) eritrócitos, (B) leucócitos, (C) plaquetas

A

Eritrograma das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

Eritrócitos (10^6/mm³)	5 dias $\bar{x}$ (n = 06)	15 dias $\bar{x}$ (n = 06)	25 dias $\bar{x}$ (n = 06)
Oroenteral	12,4±0,7	10,3±0,4	9,9±0.6
Endovenoso	17,3±0,3	12,6±0,6	11,3±0,8
Endotraqueal	12,4±0,6	12,2±0,3	10,9±0,3
Intraperitoneal	19,7±1,1 ***	11,0±0.8	12,4±1,0

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*. As amostras analisadas foram as do período de 5 dias, comparadas as amostras com a via intraperitoneal.

B

Leucograma das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

Leucócitos (10^5/mm³)	5 dias $\bar{x}$ (n = 06)	15 dias $\bar{x}$ (n = 06)	25 dias $\bar{x}$ (n = 06)
Oroenteral	8,4±0,3	9,0±0.5	8,9±0,3
Endovenoso	6,8±0,7	7,1±0,9	5,6±0.3
Endotraqueal	7,0±0,4	7,4±0,5	4.8±0.2 ***
Intraperitoneal	6,1±0,3	6,8±0,4	8,4±0,6

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*. *As amostras analisadas foram as no período de 25 dias comparadas a via endotraqueal.*

C

Níveis de plaquetas das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

Plaquetas (mm³)	5 dias $\bar{x}$ (n = 06)	15 dias $\bar{x}$ (n = 06)	25 dias $\bar{x}$ (n = 06)
Oroenteral	106±1.7	111±1.8	119±1.9
Endovenoso	136±2.2	133±2,1	119±1.5
Endotraqueal	238±3.9***	104±1.7	131±2.1 ***
Intraperitoneal	117±1.9	116±1.9	127±2.0

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*. *As amostras analisadas foram no período de 5 e 25 dias comparadas com a via endotraqueal.*

Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.5 Análise Quantitativa de Marcadores Solúveis

O antígeno carcinoembriogênico ou também chamado de carcinoembrionário (CEA), é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 200 kDa. Em nosso estudo, observou-se que houve uma grande expressão do marcador na via endotraqueal no período de 15 dias vs 25 dias (*); 5 dias vs 15 dias (**),no período de 5 dias vs 25 dias (***); na via endovenosa, no período de 5 dias vx 15 dias , 15 dias vc 25 dias (**); na via intraperitoneal nos períodos de 5 dias vs 15 dias, 15 dias vs 25 dias (***) (Tabela 9). Níveis normais em ratos são apresentados 2,5 a 5 ng/mL Os demais marcadores não apresentaram diferenças significativas (Figura 9B).

Figura 9 - Análises bioquímicas de marcadores solúveis do rato *SD* em diferentes vias de administração, após o procedimento de hepatectomia, sendo (A) AFP, (B) CEA, (C) GH e (D) IGF-1

A

Análise bioquímica de AFP (alfafetoproteína) das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

AFP (IU/mL)	5 dias	15 dias	25 dias
	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)
Oroenteral	0,83±0,7	0,83±0,7	0,81±0,7
Endovenoso	0,83±0,7	0,83±0,7	0,83±0,8
Endotraqueal	1,20±0,6	0,76±0,4	0,83±0,3
Intraperitoneal	0,80±0,7	0,83±0,7	0,76±0,7

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*

B

Análise bioquímica de CEA (antígeno carcinoembrionário) das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

CEA (ng/mL)	5 dias	15 dias	25 dias
	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)
Oroenteral	2,23±0,2	0,83±0,7	0,83±0,7
Endovenoso	1,82±0,4	3,75±0,3	1,86±0,3
Endotraqueal	5,40±0,8	2,87±0,4	1,49±0,5
Intraperitoneal	5,16±0,7	2,02±0,3	6,38±1,1

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*.

C

Análise bioquímica de GH (hormônio de crescimento) das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia parcial de 70%.

GH (ng/mL)	5 dias	15 dias	25 dias
	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)
Oroenteral	0,21± 0,9	0,21±0,9	0,21±0,9
Endovenoso	0,21±0,7	0,21±0,8	0,21±0,5
Endotraqueal	0,30±1,4	0,19±0,7	0,21±0,9
Intraperitoneal	0,20±0,8	0,21±0,9	0,34±0,8

Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*

D

Análise bioquímica de IGF-1 (Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1) das diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, nos diferentes períodos estudados, após a hepatectomia após de 70%.

IGF-1 (ng/mL)	5 dias	15 dias	25 dias
	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)	$\bar{x}$ (n = 03)
Oroenteral	12,38±0,7	12,38±0,7	12,38±0,7
Endovenoso	12,38±0,7	12,38±0,7	12,38±0,7
Endotraqueal	12,0±0,6	11,33±0,5	12,38±0,7
Intraperitoneal	12,0±0,8	12,38±0,7	11,33±0,5

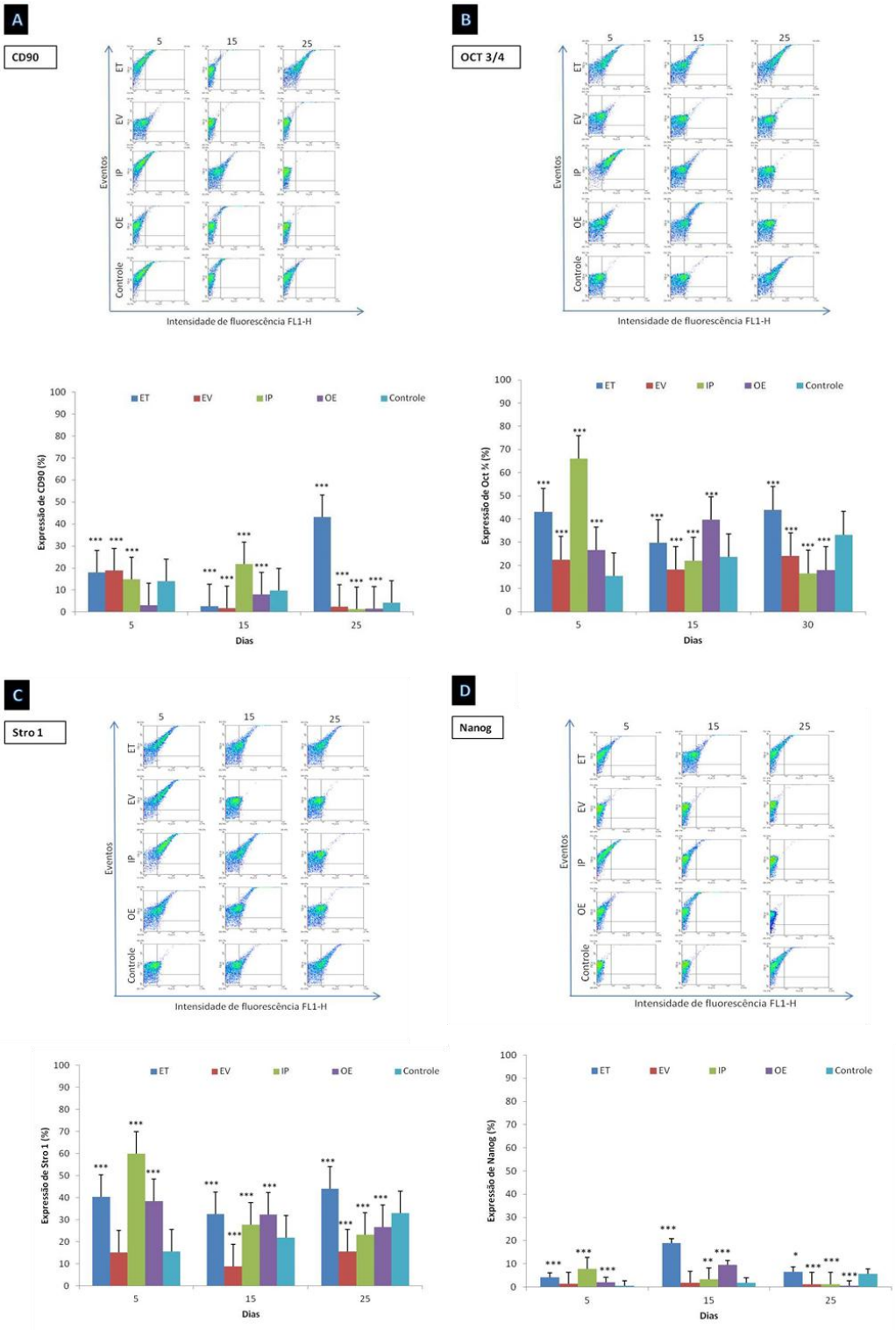
Valores de (* p< 0,05/ **p< 0,1/ *** p<0.001) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*

Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.6 Análise de Marcadores Mesenquimais por Citometria de Fluxo

A expressão dos marcadores mesenquimais, CD90 (Figura 10A), mostrou que a via traqueal, com 5 dias após a cirurgia, apresentou um aumento da expressão, se comparado ao grupo controle. Com 15 dias essa expressão diminui e após 25 dias a expressão é aumentada. A via endovenosa promoveu maior expressão em relação ao grupo controle após 5 dias de aplicação, e, no período de 15 dias, sua expressão diminuiu e continuamente até os 25 dias. Para a via intraperitoneal nota-se uma expressão semelhante a do grupo controle. Com 15 dias sua expressão aumenta e com 25 dias diminui ao longo do tratamento. Para a via oroenteral foi notada pouca expressão com 5 dias; com 15 dias pós- administração foi aumentada, mas não ultrapassou a expressão demonstrada pelo grupo controle. Após 25 dias essa expressão diminuiu significativamente. A expressão do marcador OCT 3/4 (Figura 10B) para as vias traqueal e endovenosa, mostrou-se aumentada 5 dias pós - administração. Para a via intraperitoneal apresentou-se, após 5 dias, bem aumentada. Com 15 dias, ela diminuiu um pouco e continuou a diminuir com 25 dias. Já para a via Oroenteral, apresentou-se pouca expressão com 5 dias, notando-se um aumento com 15 dias e um aumento maior aos 25 dias. O STRO1 (Figura 10C) utilizados para a análise de marcação do material coletado para as vias endovenosa e oroenteral, apresentou maior expressão com 5 dias pós - administração, diminuindo com 15 dias e apresentando um leve aumento com 25 dias. Pela via endotraqueal, com 5 dias notou-se um aumento da expressão do Oct3/4, com 5 dias ela decaiu discretamente e com 25 dias ela aumentou a expressão. Já pela via intraperitoneal, o marcador apresentou boa expressão com 5 dias, aumentou para o dobro das outras vias utilizadas. Com 15 dias, sua expressão caiu pela metade. O marcador NANOG (Figura 10D) apresentou-se pouco expresso nas vias de administração nos três períodos estudados. Apenas notou-se uma expressão maior da via endotraqueal com 15 dias, evidenciando seu pico de expressão no processo de regeneração do fígado.

Figura 10 - Análise de marcadores mesenquimais nos fígados de ratos ,em diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráficos dot plot e gráficos de barras dos resultados obtidos da expressão dos marcadores (A) CD90. (B) Oct ¾. (C) Stro1. (D) Nanog. (***p<0.05)

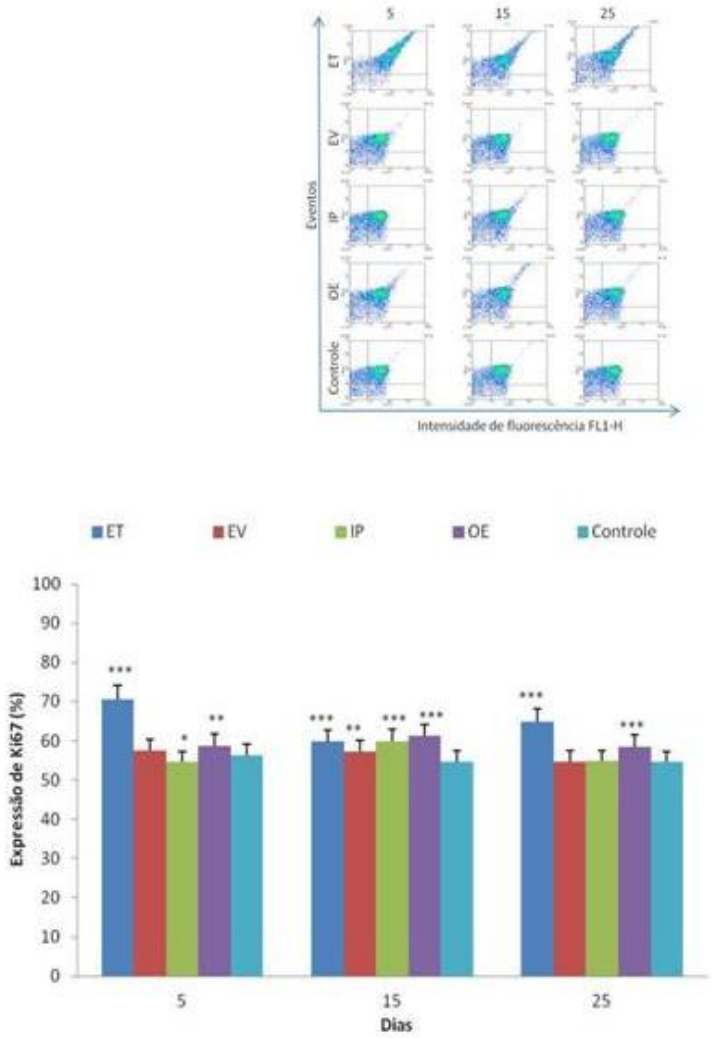


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.7 Análise da Proliferação Celular por Citometria de Fluxo

A determinação de células em fase proliferativa foi dada através da utilização do marcador proliferativo Ki67, o qual se mostrou mais expresso na via de administração endotraqueal, nas fases de 5, 15 e 25 dias. Essa expressão foi constante e ascendente com o passar dos dias, mostrando a eficiência da via de administração. Nota-se também que a expressão das outras vias endovenosa, intraperitoneal e oroenteral, foram constantes, um pouco maiores que o grupo controle. Ele também evidenciou uma constante proliferação do fígado, até mesmo no grupo controle, mostrando a capacidade regenerativa do órgão (Figura 11).

Figura 11 - Análise de marcador de proliferação celular no fígado de ratos,em diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráfico dot plot e gráfico de barras dos resultados da expressão dos marcador Ki-67 (***p<0.05)



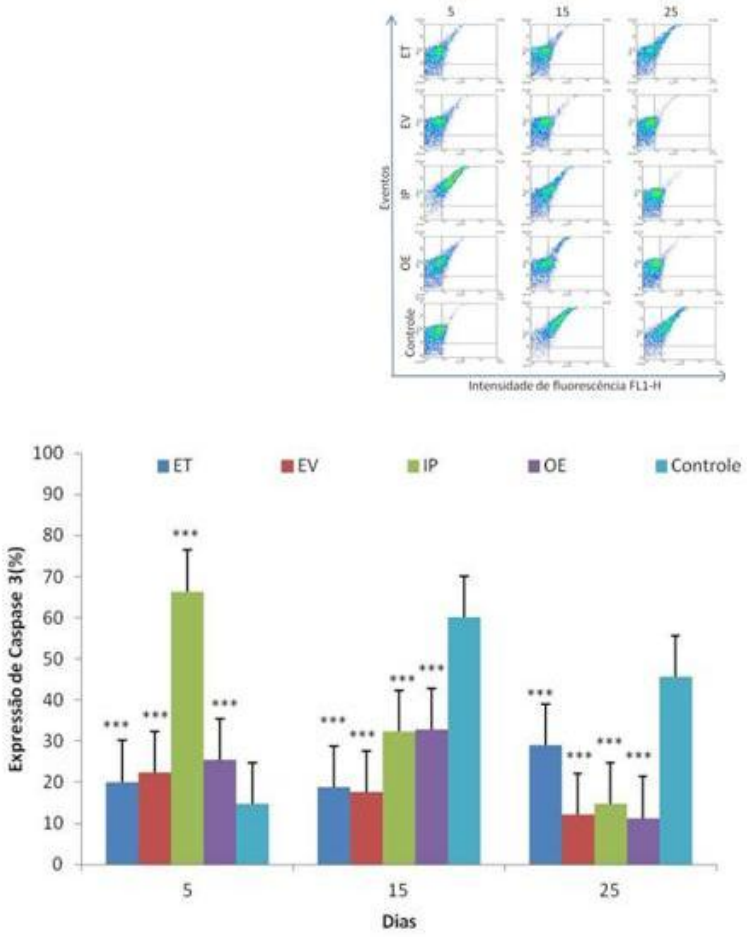
Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.8 Análise de Morte Celular por Citometria de Fluxo

A determinação da quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, foi determinada pela expressão do marcador Caspase-3 clivada em tecido hepático de ratos macerados em diferentes vias de administração.Nossos resultados mostraram que no período de 5 dias a via Intraperitoneal apresentou uma maior expressão da Caspase 3, identificando uma maior morte celular por apoptose. Porém, nos períodos de 15 e 25 dias, o grupo controle

apresentou uma maior expressão da caspase, que sinaliza a morte por apoptose, pois cliva os substratos com resíduos de aspartato. A caspase 3 é uma caspase executora, e com os resultados obtidos mostraram, a eficiência das células-tronco do broto hepático no controle de morte celular. Os dados dos valores médios ± DP e os histogramas representativos adquiridos pelo citômetro pelo programa *Cell Quest* e analisados pelo programa *WInMdi*.2.9 (figura 12).

Figura 12 - Análise de marcador de morte celular por apoptose no fígado de ratos e, diferentes vias de administração das células do broto hepático de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráfico dot plot e gráfico de barras dos resultados da expressão do marcador Caspase 3 (***p<0.05)

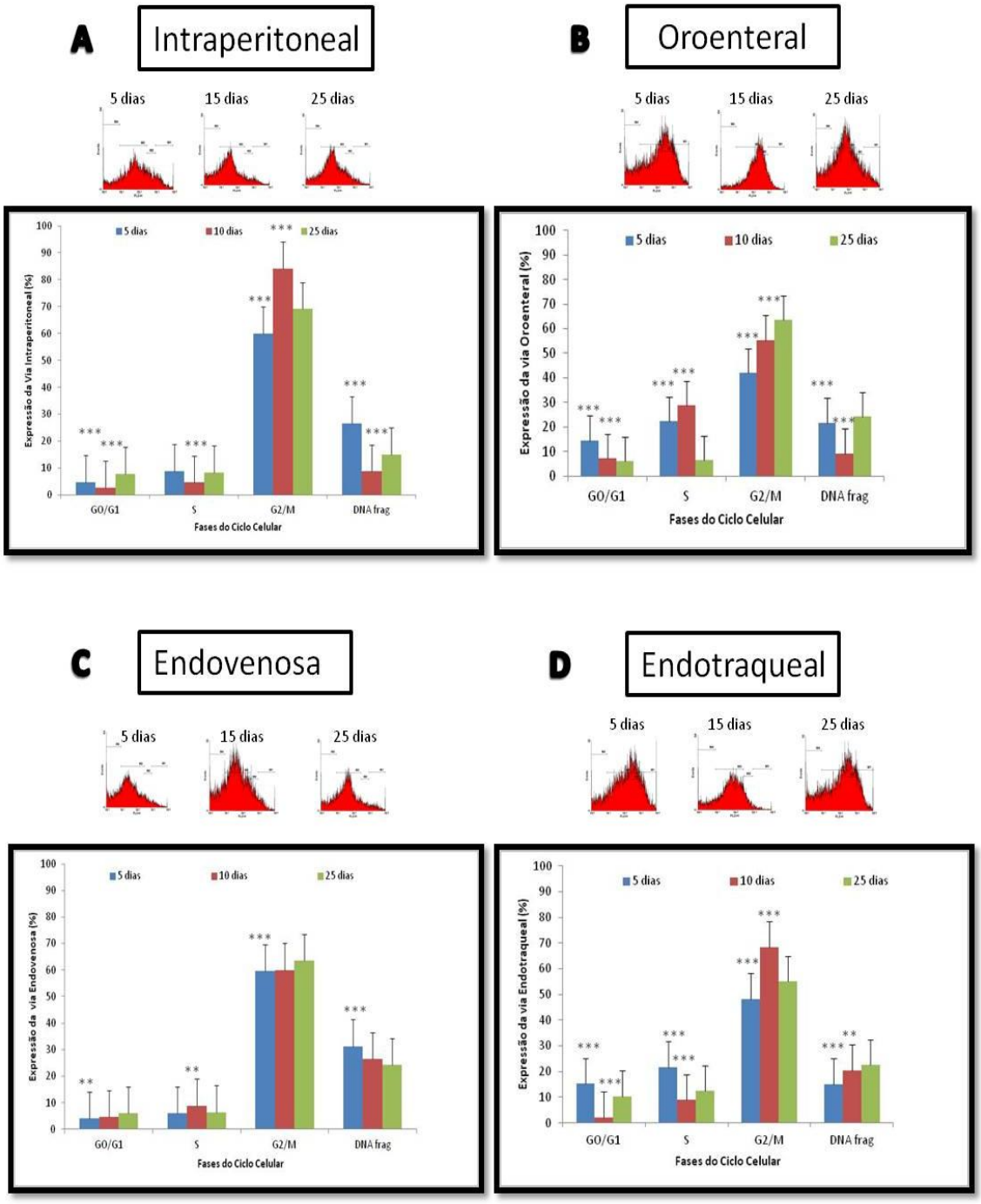


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.3.9 Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

A análise do ciclo celular nas quatro vias de administração das células tronco derivadas do broto hepático de ratos, demonstrou que nos períodos estudados 5, 10 e 25 dias, expressões diferentes nas fases do ciclo. Estatisticamente, no período de 25 dias notou-se que: na fase G0/G1 de proliferação, a via endotraqueal prolifera mais que as outras vias. Na fase de síntese, apresentou um maior aumento na via endotraqueal. Observou-se após 25 dias uma parada na fase G2/M nas vias intraperitoneal, via oroenteral e endovenosa. No DNA fragmentado, notou-se que há um aumento significativo nas vias oroenteral e via endotraqueal, comparadas as outras vias de administração. O que se percebe que na via oroenteral se prolifera pouco e morre muito e na via endotraqueal prolifera muito e morre muito (Figura 13).

Figura 13 - Análise do ciclo celular do fígado de ratos, em diferentes vias de administração das células dreivadas do broto hepático de ratos, após a hepatectomia parcial, apresentando gráfico de barras representando as médias e desvio padrão das diferentes fases do ciclo celular, nos diferentes períodos de 5, 15 e 25 dias. Nas vias (A) intraperitoneal, (B) oroenteral, (C) endovenosa e (D) endotraqueal. Valores de (***p<0.05) foram obtidos pelo teste de variância OneWay ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

2.4 DISCUSSÃO

O princípio da terapia celular consiste em restaurar a função de um órgão ou tecido com a substituição das células perdidas por uma enfermidade ou substituir células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético, vascular ou iatrogênico (ROCHA et al., 2012).

Na hepatectomia de 70% do fígado, foi observado um déficit metabólico que acarretou aos animais uma insuficiência hepática equivalente a dos casos de perda do órgão por trauma, gerando muitos óbitos após as cirurgias, como observado em nosso experimento (MACHADO et al., 2012). Em experimento realizado com a hepatectomia parcial em ratos, foi observado um aumento na proliferação celular e uma recuperação mais rápida da função do fígado (HUANG et al., 2015), conforme também se observou em nossos experimento, notando-se uma diferença significativa na via endotraqueal comparada às outras.

As vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos apresentaram diferentes localizações de concentrações celulares, mostrando novos caminhos de tratamento. Mediante essas análises da migração celular obtidas pela bioluminescência (PET Scan) (RICI et al., 2013), descobriu-se que, na via oroenteral, as células chegaram ao fígado e se mantiveram no parênquima constantes por um maior período de tempo. Devido ao fato de a aplicação ser feita diretamente no ducto hepático, canal que une o duodeno e o fígado, e serve normalmente para a secreção da bile.

Analisando o índice hepatossomático, a proporção, organização macroscópica e de regeneração do fígado, notou-se que a via endotraqueal apresentou significativo aumento na proporção da regeneração da massa hepática em relação às demais vias de administração, evidenciando maior regeneração hepática em relação ao peso inicial e final do fígado, após aplicação da terapia com células embrionárias do broto hepático. Isso se deve ao fato de que as células, administradas pela via endotraqueal, devem alcançar a árvore brônquica, o que faz a via ser de rápida absorção alveolar, gerando uma melhor biodistribuição para o fígado. Em fígado de ratos, não foram observadas significância no índice hepatossomático (FAN et al., 2014).

Microscopicamente foi observado que nos períodos de 5 dias o parênquima hepático está totalmente desorganizado em todas as vias estudadas, sem presença de formação de cordões hepáticos, núcleos disformes, apresentando áreas de congestão leucocitária. No período de 25 dias, já se notou uma melhora na organização tecidual na via endotraqueal,

apresentando cordões de hepatócitos, veias centrolobulares e espaços porta mais visíveis. Os achados histológicos encontrados nos tecidos lesionados deste trabalho vão de acordo com outros estudos em que os autores descrevem que o processo de inflamação, durante a lesão hepática, normalmente serve como um mecanismo de limpeza de detritos e como um estimulante para a regeneração (WOOLBRIGHT; JAESCHKE, 2015). No entanto, os níveis anormais de inflamação podem provocar mais danos do fígado e inibir a regeneração através da liberação de espécies reativas de oxigênio prejudiciais.

Após a análise dos parâmetros hematológicos pudemos observar no período de 5 dias eritrocitose e policitemia pela via intraperitoneal, o que leva a um aumento na espessura do sangue, reduzindo a sua velocidade de circulação. No leucograma apesar de observamos uma leve leucopenia na via endotraqueal, não notamos uma diferença significativa com o comparado aos parâmetros hematológicos de um rato normal. Apesar de todas as vias de tratamento apresentar valores na quantidade de plaquetas abaixo dos parâmetros normais, a via endotraqueal se mostrou mais próxima destes valores, induzindo uma melhor resposta inflamatória, com consequente aumento no potencial de cicatrização.

Os marcadores solúveis, GH, AFP e IGF-1 foram negativos para as amostras analisadas. Observamos alterações em CEA, o que é justificado pelo fato de estarem evidenciando uma toxicidade aguda e uma fibroblastia. Em ratos, portadores de carcinoma hepatocelular foi observado um aumento significativo no nível de CEA, como observado em nosso trabalho, mostrando o nível de toxicidade ou em doenças inflamatórias do fígado (SHAHAT et al., 2015).

Outro parâmetro importante a ser discutido são os marcadores de pluripotência. O CD90 é um marcador presente na interação célula-célula, célula-matrix, possui um papel importante na adesão celular, migração, inflamação, supressão de tumor, metástase, apoptose e modula fibrose (BOITANO et al., 2010). O CD90 foi bem expresso nos casos de carcinoma hepatocelular e cirrose hepática, comparados ao tecido normal (YAMASHITA et al., 2013). Em outros estudos houve grande expressão de CD90 e CD105 em experimento com hepatocarcinomas (SUKOWATI et al., 2015). Em nosso experimento observou-se uma grande expressão no período de 25 dias na via endotraqueal, evidenciando seu alto poder pluripotência.

O marcador Stro-1 é o melhor marcador a se investigar quando se deseja pesquisar a presença de células-tronco mesenquimais (KOLF; CHO; TUAN, 2007). Entretanto, esse marcador é gradualmente perdido durante a expansão em culturas. Talvez, porém, combinações como Stro-1 e CD106 poderiam constituir bons marcadores para a identificação

de células-tronco mesenquimais humanas. O marcador stro-1 foi mais bem expresso pelo grupo endotraqueal, mantendo-se alta sua expressão em 25 dias, o que nos mostra seu maior potencial mesenquimal.

Em embriões de ratos, a pluripotência é mantida primariamente pelos seguintes genes: POU5F1 (denominado de Oct-4), Sox-2 e Nanog. Esses genes são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam a genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para o desenvolvimento. A expressão de Oct-4 é considerada um marco fundamental para a identificação de células pluripotentes de rato (ROCHA et al., 2012). O Oct-4 é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, na massa celular interna, no epiblasto em início da fase pós-implantação do embrião e em células-tronco embrionárias em cultivo (PESCE; SCHÖLER, 2001; COWAN et al., 2004). O gene da proteína Oct 3/4 são expressos em várias células pluripotentes estamais adultas, bem como em células tumorais humanas e de ratos (TAI et al., 2005). O OCT ¾ atua como um gene marcador específico de totipotência ou um gene necessário para totipotência (DEYEV; POLANOWSKI, 2004). Neste trabalho, observamos que na via endotraqueal a expressão é mais alta que as outras e se mantém até o final, o que se justifica o fato de exercer sua pluripotência e renovação celular por mais tempo.

O Nanog é um bom candidato a marcador de pluripotência, o gene Nanog também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extraembrionária, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz à geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (ROCHA et al., 2012). Sua hiperexpressão permite o crescimento em sistemas livres do cocultivo e melhora a eficiência na produção de células clones a reprogramação das células adultas, pois faz com que voltem a ser estaminais embrionárias. O Nanog é responsável por transformar as células pré-estaminais em estaminais.

Em estudos sobre a regeneração hepática com a Ki-67, constatou-se a eficácia do método em ratos (BASOGLU et al., 2000). Em outro estudo, a avaliação pelo marcador Ki-67 mostrou que, 96 horas após a hepatectomia nos animais do grupo tratado, o número de células proliferando foi semelhante ao encontrado previamente ao estímulo regenerativo (AGUIAR et al., 2009). Tendo, Ki-67 como número de hepatócitos em proliferação, observou-se que os fígados deficientes apresentaram um aumento no número de células Ki-67 positivas, indicando proliferação em resposta compensatória à morte celular (YU et al., 2015). Em outro experimento, após a hepatectomia parcial de 70%, o nível de Ki-67 aumentou gradualmente até às 40 horas após a cirurgia, depois houve uma queda abrupta do nível (KONSTANTINOS

et al., 2014). Em contraposição, nosso experimento mostrou que, após a hepatectomia parcial, não há diferença nos grupos, nem mesmo no grupo controle, evidenciando o poder regenerativo do fígado.

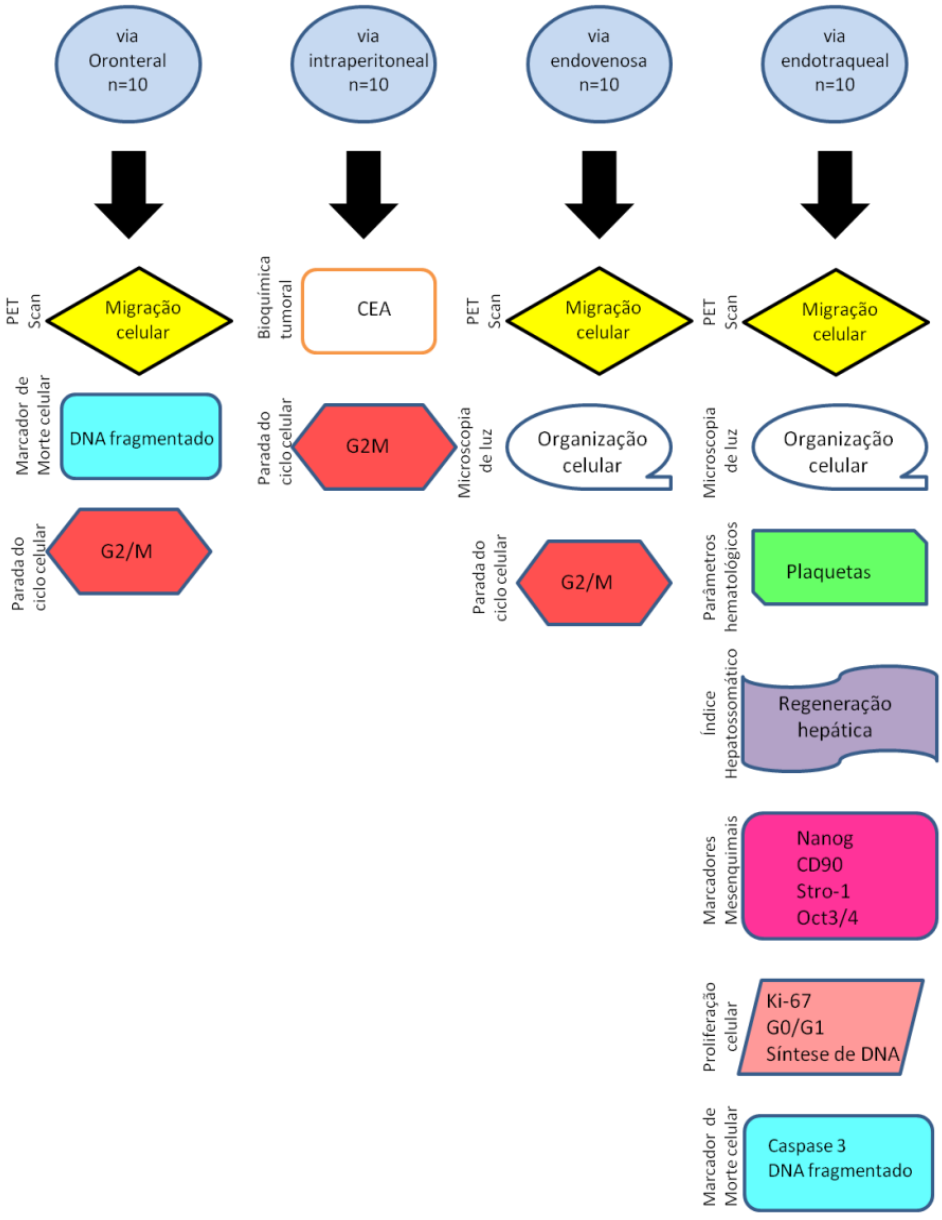
A apoptose é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas, características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICHI; REGNER; ROCHA, 2007). Em nosso experimento observou -se uma maior expressão da caspase-3 na via intraperitoneal (5 dias), o que nos evidencia uma maior reparação tecidual. E uma maior expressão no grupo controle (15 e 25 dias), o que nos evidencia que o transplante de células derivadas do broto hepático inibe o processo de apoptose, o que se torna essencial para aumentar a eficácia do transplante de células, derivadas do broto hepático (JUNG et al., 2009). Em alguns experimentos (MURACA RERUNDA; NERI, 2002; LIU et al., 2013), houve inibição do processo inflamatório e da apoptose, ativação de células estreladas hepáticas, redução na geração da matriz extracelular, degradação do excesso intra-hepático na matriz extracelular e melhora da fibrose do fígado.

O conceito de ciclo celular, introduzido em 1953, tem auxiliado no delineamento de diversos eventos que governam a proliferação das células de mamíferos (SAELENS et al., 2004). No ciclo celular, notou-se grande quantidade de células paradas na fase G2/M (via intraperitoneal, oroenteral e endovenosa) indicando os efeitos proliferativos da terapia regenerativa. Entretanto, a via endotraqueal apresentou aumento na síntese de DNA, além de aumento na expressão de Ki67, indicando aumento na taxa de proliferação e regeneração tecidual.

Com base em nossos resultados, as células do broto hepático administradas na via endotraqueal apresentaram melhor equilíbrio entre proliferação e morte celular, com maior expressão dos marcadores de pluripotência, com apresentação de melhor organização celular e regeneração tecidual, tornando-se assim a melhor opção para o modelo de regeneração hepática aqui estudado.

Em conclusão, a via endotraqueal se mostrou melhor em todos os aspectos da organização, arranjo da arquitetura hepática e funções celulares, evidenciando uma maior reparação tecidual (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma ilustrativo dos principais efeitos observados nas diferentes vias de administração das células derivadas do broto hepático de ratos com 12.5 dias de gestação



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Considerações finais

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram obtidas células derivadas do broto hepático de ratos *Sprague dawley e* estabelecido um modelo experimental de hepatectomia de 70% do fígado de ratos. Foram testados os protocolos das vias de administração das células derivadas do broto hepático para a terapia de reparação do parênquima hepático, sendo eleitas as vias de administração de células derivadas do broto hepático na reparação tecidual hepática: via endotraqueal, via oroenteral, via intraperitoneal e via endovenosa, respectivamente.

A via endotraqueal se mostrou melhor em todos os aspectos estudados, tornando-se a eleita de preferência na via de administração das células derivadas do broto hepático de ratos para tratamento de doenças hepáticas. Ela se mostrou mais rápida, mais segura e de maior rapidez na regeneração celular em relação às demais vias, apesar de todas as vias terem uma eficácia terapêutica.

Referências

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. R. F.; NASSIF, L.; RIBAS, C. A. P. M.; NASCIMENTO, M. M.; WIEDERKER, J. C.; PACHNICKI, J. P. A.; FILHO, E. S. Hepatic regeneration after parcial oclusion of hepatic vein drainage in rats ABCD. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 22, n. 1, p. 89-95, 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell.** 5. ed. New York: Garland Science, 2008. 1157 p.

ALMEIDA-PORADA, G.; ZANJANI, E.; PORADA, C. D. Bone marrow stem cells and liver regeneration. **Experimental Hematology**, v. 38, n. 7, p. 574-580, 2010.

ASSY, N.; MINUK, G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **Journal of Hepatology**, v. 26, n. 4, p. 945-52, 1997.

Associação Brasileira dos Transplantados de Fígado e Portadores de Doenças Hepáticas. 2015. Disponível em: <http://www.lfb.com.br/links-relacionados/associacao-brasileira-dos-transplantados-de-figado-e-portadores-de-doencas-hepaticas/>. Acesso em: 15 dez. 2015.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Manoele, 1994. 629 p.

BASOGLU, M.; BALIK, A. A.; KAVAK, I.; GUNDOGDU, C.; ERMAN, Z.; YILDIRGAN, I.; ÖREN, D. Effects of Growth Hormone on Hepatic Regeneration. **Turkish Journal of Medicine Science**, v. 30, n. 4, p. 529-534, 2000.

BOITANO, A. E.; WANG, J.; ROMEO, R.; BOUCHEZ, L. C.; PARKER, A. E.; SUTTON, S. E.; WALKER, J. R.; FLAVENY, C. A.; PERDEW, G. H.; DENISON, M. S.; SCHULTZ, P. G.; COOKE, M. P. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. **Science**, v. 329, n. 5597, p. 1345-1348, 2010.

BORT, R.; SIGNORE, M.; TREMBLAY, K.; MARTINEZ-BARBERA, J. P.; ZARET, K. S. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. **Developmental Biology**, v. 290, n. 11, p. 44-56, 2006.

CHOW, P. L.; STOUT, D. B.; KOMISOPOULOU, E.; CHATZIIOANNOU, A. F. A method of image registration for small animal, multi-modality imaging. **Physics in Medicine and Biology**, v. 51, n. 2, p. 379-390, 2006.

COWAN, C. A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J. P.; WANG, S.; MORTON, C. C.; MCMAHON, A. P.; POWERS, D.; MELTON, D. A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 13, p. 1353-1356, 2004.

DEYEV, I. E.; POLANOVSKY, O. L. The Oct genes and Oct proteins. **Molecular Biology**, v. 38, n. 1, p. 48-55, 2004.

FAN, Q. M.; JING, Y. Y.; YU, G. F.; KOU, X. R.; YE. F.; GAO, L.; LI, R.; ZHAO, Q. D.; YANG, Y.; LU, Z. H.; WEI, L. X. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Cancer Letters**, v. 352, n. 2, p. 160-168, 2014.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis: emerging therapies. **Digestive Diseasis**, v. 33, n. 4, p. 504-507, 2015.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1998.

GRIVICICHI, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte cellular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAM, D. S.; SONG, M. S.; PARK, H. S.; RHEE, M.; YANG, H. K.; LEE, S. H.; KIM, J. W.; JUNG, E. S.; YOON, K. H. Successful xenotransplantation with re-aggregated and encapsulated neonatal pig liver cells for treatment of mice with acute liver failure. **Xenotransplantation**, v. 22, n. 4, p. 249-59, 2015.

HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M. Experimental pathology of the liver- Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Archieves of Pathology**, v. 12, n. 3, p. 186-202, 1931.

HUANG, L.; DAMLE, S. S.; BOOTEN, S.; SINGH, P.; SABRIPOUR, M.; HSU, Y. J. KATZ, M.; WATT, A.; HART, C. E.; FREIER, S. M.; MONIA, B. P.; GUO, S. Partial hepatectomy induced long noncoding RNA inhibits hepatocyte Proliferation during liver regeneration. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132798, 2015.

IRFAN, A.; AHMED, I. Hepatocellular carcinoma: could stem cell therapy ever be a viable solution? **Elective Medicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 273-276, 2014.

JUNG, K. H.; SHIN, H. P.; LEE, S.; LIM, Y. J.; HWANG, S. H.; HAN, H.; PARK, H. K.; CHUNG, J. H.; YIM, S. V. Effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a cirrhotic rat model. **Liver International**, v. 29, n. 6, p. 898-909, 2009.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KONSTANTINOS, N.; KALLIOPI, T. T.; ZYGA, K. S.; PAPALIMNEOU, V.; TSIRONI, M.; GRYPIOTI, A. D.; PROTOPSALTIS, I.; PANIDIS, D.; PANOUTSOPOULOS, G. I.

Effect of 5-HT7 receptor blockade on liver regeneration after 60-70% partial hepatectomy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, 201, 2014.

LABRECQUE, D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. **American Jounal of Gastroenterology**, v. 89, n. 1, p. 86-96, 1994.

LIU, X.; XU, J.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts. **Current Pathobiology Reports**, v. 1, n. 3, p. 209-214, 2013.

LUNA, A. C. L.; PASSOS, C. C.; MIGLINO, M. A.; GUERRA, R. R. Caracterização histológica do desenvolvimento hepático em diferentes estágios embrionários de ratos. **Ciência Rural**, v. 43, n. 6, p. 1070-1075, 2015.

MACHADO, M. A., FERRARI, M. F.; SURJAN, R. C. T. Hepatectomia videolaparoscópica: experiência pessoal com 107 casos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 39, n. 6, p. 483-488, 2012.

MALHI, H.; IRANI, A. N.; GAGANDEEP, S.; GUPTA, S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with expansive replication capacity and differentication into mature hepatocyte. **Journal of Cellular Science**, v.115, n. 13, p. 2679-2688, 2002.

MANZINI, B. M.; DUARTE, S. S. A.; SANKARAMANIVEL, S.; RAMOS, A. L.; LATUF-FILHO, P.; ESCANHOELA, C.; KHARMANDAYAN, P.; OLALLA-SAAD, S. T.; BOIN, I.; MALHEIROS, L. Â. C. Useful properties of undifferentiated mesenchymal stromal cells and adipose tissue as the source in liver-regenerative therapy studied in an animal model of severe acute fulminant hepatitis. **Cytotherapy**, v. 17, n. 8, p. 1052-1065, 2015.

MENDES-BRAZ, M.; ELIAS-MIRO, M.; KLEUSER, B.; FAYYAZ, S.; JIMENEZ-CASTRO, M. B.; MASSIP-SALCEDO, M.; RAMALHO, F. S.; RODER, J.; PERALTA, C. The effects of glucose and lipids in steatotic and non-steatotic livers in conditions of partial hepatectomy under ischaemia-reperfusion. **Liver Internacional**, v. 34, n. 7, p. 271-289, 2014.

MIGLIACCIO, G.; MIGLIACCIO, A. R.; PETTI, S.; MAVILIO, F.; RUSSO, G.; LAZZARO, D.; TESTA, U.; MARINUCCI, M.; PESCHLE, C. Human embryonic hepatompoiesis: kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition. **Journal of Clinical Investigation**, v.78, n. 1, p.51-60, 1986.

MICHALOPOULOS, G. K. Advances in liver regeneration. **Expert Review of Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 8, p. 897-907, 2014.

MOORE, R. N.; DASGUPTA, A. RAJAEI, N.; YARMUSH, M. L.; TONER, M.; LARUE, L.; MOGHE, P. V. Enhanced differentiation of embryonic stem cells using co-cultivation with hepatocytes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 6, p. 1332-1343, 2008.

MURACA, M.; GERUNDA, G.; NERI, D. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. **The Lancet**, 359, n. 9303, p. 317-318, 2002.

MURACA, M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 3, p. 180-187, 2008.

MURAOKA, K.; SHINGO, T.; YASUHARA, T.; KAMEDA, M.; YUAN, W.; HAYASE, H.; MATSUI, T.;; MIYOSHI, Y.; DATE, I. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus **Experimental Neurology**, v. 199, n. 3, p. 311-327, 2006.

NACIF, L.; FERREIRA, A. O.; MARIA, D. A.; CARNEIRO, L. A.; ANDRAUS, W. Which is the best route of administration for cell therapy in experimental model of small-for size syndrome in rats? **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 100-106, 2015.

OKANO, J.; SHIOTA, G.; KAWASAKI, H. Protective action of hepatocyte growth factor for acute liver injury caused by D-galactosamine in transgenic mice. **Hepatology**, v. 26, n. 5, p. 1241-1249, 1997.

OLIVOTTI, A. F. **Obtenção e caracterização de células tronco do broto hepático de ratos para terapia celular**. 2011. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2011.

PAES-BARBOSA, J. H. P. B.; MASSAROLLO, P. C.; BERNARDO, W. M.; FERREIRA, F. G.; BARBOSA, F. K.; RASLAN, M.; SZUTAN, L. A. Systematic review and meta-analysis of biliary reconstruction techniques in orthotopic deceased donor liver transplantation. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Science**, v. 18, n. 4, p. 525-536, 2011.

PARK, L. K.; LEE, D. H. J. Bioartificial liver systems: current status and future perspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 311-319, 2005.

PASSOS, C. C. **Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fisher**. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells,** v. 19, n. 2, p. 271-278, 2001.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n. 13, p. 1918-1934, 2005.

QU, X.; LAM, E.; DOUGHMAN, Y. Q. Cited2, a coactivator of HNF4α, is essential for liver development. **The EMBO Journal**, v.26, n. 21, p. 4445-4456, 2007.

RAMALHO, F.; VELOSA, J.; COSTA, A..; BAPTISTA, A.; DE MOURA, M. C. The intrahepatic expression of the hepatitis B virus in chronic delta hepatitis. **Acta Medica Portuguesa**, v. 6, n. 2, p. 187-191, 1993.

RICI, R. E. G.; WILL, S. E. A.; FAVARON, P. O.; FRATINI, P.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARIA, D. A. Modulation of angiogenesis and immune response in canine osteosarcoma by BMP-2 and mesenchymal stem cells. **Journal of Stem Cell Research and Therapy**, v. 3, 143, 2013.

ROCHA, A. S.; MAIA, L.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R. LANDIM-ALVARENGA, F. C. Considerações Sobre Células-Tronco Embrionárias. **Veterinária e Zootecnia,** v. 19, n. 3, p. 303-313, 2012.

SADLER, K. C.; KRAHN, K. N.; GAUR, N. A..; UKOMADU, C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A**, v. 104, n. 5, p. 1570-1575, 2007.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE, L.; VAN-GURP, M.; VAN-LOO, G, VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogenese**, v. 23, n. 16, p. 2861-2874, 2004.

SANCHES, S. C.; RAMALHO, L. N.; MENDES-BRAZ, M.; TERRA, V. A.; CECCHINI, R.; AUGUSTO, M. J.; RAMALHO, F. S. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 65-71, 2014.

SANTOS, R. O. C.; STRACIERI, L. D. S.; VICENTE , Y. A. M. V. A.; GARRIDO, J. J. P.; PILEGGI, F. O. A hepatectomia parcial em cirurgia pediátrica partial hepatectomy in pediatric surgery. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 30, n. 1, p. 51-58, 2003.

SELDEN, C.; HODGSON, H. Cellular therapies for liver replacement. **Transplant Immunology**, v. 12, n. 2, p. 273-288, 2004.

SHAHAT, A. A.; ALSAID, M. S.; KOTOB, S. E.; AHMED, H. H. Significance of Rumex vesicarius as anticancer remedy against hepatocellular carcinoma: a proposal-based on experimental animal studies. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention**, v. 16, n. 10, p. 4303-4310, 2015.

SPENCE, J. R.; WELLS, J. M. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endorine cells from embryonic stem cells. **Developmental Dynamics,** v. 236, n. 12, p. 3218-3227, 2007.

STÖCKER, E.; WULLSTEIN, H. K.; BRÄU, G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continous

infusion of 3H-thymidine. **Virchows Archieves of Biology and Cell Pathology**, v. 14, n. 2, p. 93-103, 1973.

SUKOWATI, C. H.; ANFUSO, B.; CROCÉ, L. S.; TIRIBELLI, C. The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis. **BMC Cancer**, v. 15, 188, 2015.

TAI, M. H.; CHANG, C. C.; KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; OLSON, L. K.; TROSKO, J. E. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 495-502, 2005.

TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F.; RAMALHO, L. N.; SILVA, T. C.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; SILVA, O. C.; ZUCOLOTO, S. Cellular aspects of liver regeneration. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, Suppl 1:63-66, 2006

THONSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S. JONES, C. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts**. Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

WOOLBRIGHT, B. L.; JAESCHKE, H. Therapeutic targets for cholestatic liver injury. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 4, p. 463-475, 2015.

YAMADA, K. M.; KEMLER, R. Cell to cell contact and extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 527-530, 2002.

YAMASHITA, T.; HONDA, M.; NAKAMOTO, Y.; BABA, M.; NIO, K.; HARA, Y.; ZENG, S. S.; HAYASHI, T.; KONDO, M.; TAKATORI, H.; YAMASHITA, T.; MIZUKOSHI, E.; IKEDA, H.; ZEN, Y.; TAKAMURA, H. WANG, X. W.; KANEKO, S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1484-1497, 2013.

YU, J-Q.; ZHOU, Q.; ZHENG, Y-F.; BAO, Y. Expression of vimentin and Ki-67 proteins in cervical squamous cell carcinoma and their relationships with flinicopathological Features. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 10, p. 4271-4275, 2015.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco**: a Nova Fronteira da Medicina. São Paulo: Atheneu, 2006. 245 p.

ZORN, A. M. **Liver development**: stem book. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2008. 211 p.

ANEXO A

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS INDIFERENCIADAS DERIVADAS DO BROTO HEPÁTICO DE RATOS: SUBSÍDIOS PARA UTILIZAÇÃO EM TERAPIA CELULAR

RESUMO

Este estudo avaliou o potencial e o controle da resposta proliferativa de células do broto hepático de ratos Fischer 344 em cultura. Células do broto hepático foram obtidas aos 12,5, 14,5 e 16,5 dias de gestação e cultivadas em meio DMEM-F12. A caracterização morfológica foi realizada em microscopia invertida de luz e eletrônica de varredura. Marcadores de células mesenquimais, progressão e fases do ciclo celular, morte celular, potencial elétrico mitocondrial foram estudados por citometria de fluxo. A função bioquímica foi estudada pela análise das transaminases hepáticas e alfafetoproteína. A expansão e caracterização de uma cultura primária foi obtida nos diferentes dias de gestação estudados. Células fusiformes, *fibroblast-like cells* foram observadas em todos os períodos estudados. Concentrações das transaminases hepáticas AST, ALT e AFP foram menores aos 12,5 dias. Marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90, Nanog, Oct ¾ e STRO1), envolvidos na checagem e progressão do ciclo celular (P53, P21, P27 e Ciclina D1) e marcadores envolvidos na morte celular (Anexina V/PI, Caspase3, Bax, Bad e Bcl2) foram diferencialmente expressos, nos períodos estudados. A análise do potencial elétrico mitocondrial aos 14,5 e 16,5 dias foi maior na proporção de células inativas, com menor capacidade funcional ou metabólica. Análise das fases do ciclo celular demonstrou concentração de célula na fase G0/G1 no período de 12,5 dias, repercutindo na modulação da capacidade de proliferação e aumento na proporção de células com DNA fragmentado aos 16,5 dias. As linhagens de células do broto hepático demonstraram grande capacidade proliferativa, mantendo-se pluri e totipotente, não apresentando marcadores de transformação neoplásica ou de erros genéticos, que controlam a progressão de crescimento e diferenciação celular normal.

Palavras-chave: Células-tronco embrionária e fetal. Broto hepático. Medicina regenerativa. Citometria de fluxo. Transaminases hepáticas.

INTRODUÇÃO

Nas últimas cinco décadas, as doenças hepáticas têm sido cada vez mais prevalentes e muitas vezes exigem intervenção médica considerável. No entanto, as opções de tratamento atuais têm demonstrado problemas graves, sendo necessárias investigações para fornecer alternativas adequadas. Estes tratamentos são dificilmente disponíveis, muito caros e apresentam um custo elevado para a qualidade de vida do paciente. A introdução da terapia regenerativa com células-tronco em doenças hepáticas tem sido anunciada como o futuro da medicina personalizada e pode ser a alternativa que o sistema de saúde pública (IRFAN; AHMED, 2014).

As doenças envolvendo órgãos endodermicamente derivados, particularmente o fígado, afetam milhares de pessoas no mundo. No fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas, muitas das lesões são tão prejudiciais que este mecanismo de reparação é insuficiente, tornando o transplante a única opção (MURACA; GERUNDA; NERI, 2002; MURACA, 2008; SELDEN; HODGSON, 2004). Outra via de tratamento, para os pacientes de doenças hepáticas é estimular a regeneração do tecido *in vivo* ou gerar tecido de substituição *in vitro* (PASSOS, 2010).

Células-tronco mesenquimais isoladas de ratos são frequentemente utilizadas para pesquisas de engenharia tecidual. No entanto, foram identificadas diferenças entre as células estaminais mesenquimais de rato e as derivadas de humanos, e atualmente não existe nenhum painel de marcadores definidos para o isolamento destas células (DAVIES et al., 2001).

Células progenitoras hepáticas (HPC) são encontradas naturalmente e especificamente no fígado. No entanto, o mecanismo de ação das mesmas não é totalmente compreendido, mas tem sido provado que a população de células aumenta proporcionalmente a gravidade da progressão da doença. Uma vez que estas células podem ser derivadas a partir de sangue de cordão umbilical humano, a seu transplante tem sido sugerido como uma opção de tratamento para neutralizar a insuficiência hepática. Entretanto, a replicação de HPC em excesso pode levar a carcinoma hepatocelular, tornando seu uso contraindicado. O argumento apresentado contra este caso é que, em lesão hepática grave, a população natural de HPC é insuficiente para permitir regeneração e, consequentemente, a infusão destas células pode permitir um maior grau de regeneração (IRFAN; AHMED, 2014).

Células derivadas de fígado fetal mostraram-se como uma fonte rica em células progenitoras/estaminais. No entanto, o enriquecimento de células progenitoras hepáticas do

fígado humano embrionário, apresentaram com uma maior viabilidade e com a mínima rejeição no transplante alogênico, continuando a ser um desafio significativo para o avanço das abordagens terapêuticas para doenças do fígado. Há cada vez mais evidências que sugerem que o fígado fetal humano abortado é uma fonte de transplante de células progenitoras hepática (DUNCAN, 2003), entretanto, com várias restrições étnicas e jurídicas.

Durante a maturação, os hepatócitos em cultura podem ser uma fonte importante para a terapia celular em indivíduos com doenças hepáticas ou nos defeitos genéticos na formação do parênquima hepático e biliar, portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial e o controle da resposta proliferativa de células do broto hepático de ratos de diferentes idades gestacionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Para este estudo, foram utilizados 20 fêmeas e 10 machos de linhagem de ratos isogênicos Fischer 344, a qual apresenta vantagens experimentais sob outros ratos não isogênicos, como a histocompatibilidade e a uniformidade genotípica e fenotípica, reduzindo o número de animais no experimento e permitindo a reprodutividade dos experimentos (BAPTISTA et al., 2011). Essa linhagem tem sido utilizada principalmente em pesquisas envolvendo terapia celular e transplante autólogo (MIN et al., 2005; MURAOKA et al., 2006).

Acasalamentos e Obtenção dos Embriões

Os acasalamentos das ratas isogênicas F344 para obtenção dos embriões em diferentes períodos gestacionais foram realizados após verificação do ciclo estral destas. Lavado vaginal com solução fisiológica 0,9% foi realizado na manhã seguinte à junção dos casais para verificação da presença de espermatozoides, em lâminas histológicas, com auxílio de microscópio de luz, sendo contabilizado, quando da presença de espermatozoides no lavado vaginal, o dia embrionário 0,5 (E0. 5). Cinco embriões de ratos F344 aos 12.5 (E12. 5), 14. 5 (E14. 5) e 16. 5 (E16. 5) dias de gestação (foram coletados após eutanásia das ratas com a utilização de isofluorano por tempo prolongado e exsanguinação como metodologia complementar de eutanásia.

Obtenção das Células do Broto Hepático

Os animais foram inicialmente acondicionados em uma caixa de indução onde receberam isofluorano em oxigênio a 100%. Ao apresentarem sinais de relaxamento muscular, foram retirados da caixa de contenção e a eutanásia foi realizada com auxílio de máscara de tamanho apropriado e o anestésico administrado através de circuito de Magill adaptado para ratos. Os embriões E12.5 e os fetos E14.5 e E16.5 foram coletados por meio de uma incisão pré-retroumbilical nas ratas prenhe. Os cornos uterinos foram removidos da cavidade abdominal. Incisões cirúrgicas nos sacos gestacionais foram realizadas, a fim de promover a exposição dos embriões e fetos, bem como dos anexos fetais. Os embriões e os fetos foram coletados em placas de Petri e lavados com solução de PBS-L, a coleta do broto hepático realizada por meio de uma incisão longitudinal no intestino primitivo do embrião com o auxílio das lupas estereoscópicas e materiais para micro cirurgia. Todo o material foi coletado em condições assépticas adequadas, sendo todo o procedimento realizado dentro do fluxo laminar do Laboratório de Cultivo Celular do Programa de Pós-Graduação de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os materiais utilizados, a superfície de contato e o ambiente foram esterilizados, reduzindo assim as chances de qualquer tipo de contaminação das amostras.

Cultivo Celular

As amostras do broto hepático coletadas foram lavadas com solução de PBS e submetidas à fragmentação mecânica com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos. Os fragmentos resultantes foram implantados em garrafas de cultivo, as quais foram previamente preenchidas com meio de cultura: DMEM/F12, 15% Soro Fetal Bovino (Hyclone), 1% de estreptomicina, 1% penicilina e 1% glutamina. As células foram incubadas a uma temperatura de 37^{o} C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de $CO_{2.}$ Após a confluência das garrafas de 25cm², as células da garrada foram submetidas à dissociação enzimática das células aderentes por tripsinização, centrifugação, então foram ressuspendidas e recultivadas para novas garrafas com maior superficie para aumento da densidade celular e congelamento para constituição de um banco de células.

Caracterização Morfológica da Cultura de Células do Broto Hepático

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD-Sony. As células, cultivadas em placas de Petri sobre lamínulas, foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 2hs e coradas por hematoxilina, em seguida digitalizadas em microscópio invertido, acoplado a um sistema de captura de imagem CCD-Sony.

Para análise por microscopia eletrônica de varredura, as células foram cultivadas em placas de Petri de 3cm de diâmetro. Após a confluência, o meio de cultivo foi retirado e adicionado o fixador glutaraldeído (3%). Após 2 horas o fixador foi retirado e as placas foram lavadas em água destilada e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora, seguida de lavagens em água destilada e série crescente de álcool etílico (50°-100°). As placas com o cultivo celular foram desidratadas em estufa 37°. Então, foram submetidas a um revestimento metálico (“sputting”) com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550, sendo analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP.

Análise das Transaminases Hepáticas

As células do broto hepático E12.5, E14.5 e E16.5, foram cultivadas em meio DMEN-F12, suplementado com 15% de soro fetal bovino e antibióticos, em placas de 6 *wells* com a concentração inicial de $1x10^5$ células/mL por 24 horas para adesão e confluência celular. Após este período, o meio de cultura foi removido, as células foram tripsinizadas, recolhidas em um microtubo e em seguida foi adicionado o mesmo volume de tampão PBS com 10% de soro fetal bovino. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm e os sobrenadantes descartados. Ao pellet resultante foi adicionado 200µL de PBS e os microtubos foram mergulhados em nitrogênio líquido por 1 minuto para rompimento das membranas celulares. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 8000 rpm e os sobrenadantes recolhidos. Em um microtubo foi adicionado 700µL de tampão PBS, 100µL do sobrenadante recolhido e 200µL do reagente de Bradford. Após agitação moderada, a leitura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 594nm.Os valores de proteínas totais foram expressos em microgramas por mililitro (µg/mL).

Análise da Expressão Celular por Citometria de Fluxo

As amostras do fígado foram maceradas e filtradas para obtenção das células. As mesmas foram ressuspendidas em Tampão FACS e separadas em tubos de citometria. Para os marcadores intracitoplasmáticos e nucleares as células foram permeabilizadas previamente com 5µl de Triton X-100 0,1% por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos:Nanog, CD90, Stro-1, Oct 3/4, P21, P27, P53,Ciclina D1, Anexina V/PI, Caspase-3, Bax, Bad, BCL-2, CD117, CD34, CD44, CD14. Então, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante desprezado e o pellet foi ressuspendido em 100ul e adicionado 1ul de anticorpo secundário (FITC mouse antiIGgGoat). A análise das amostras foi realizada no Citômetro de Fluxo (FACSCalibur), a expressão dos marcadores foi determinada pela comparação com um isotipo controle.

Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial

Para a análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) foi utilizado o fluorocromo Rodamina 123 (Invitrogen). As células derivadas do broto hepático dos ratos Fischer 344 foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, e adicionas 5 µL de Rodamina 123 (5mg/mL). A seguir, as células foram incubadas em estufa de CO^2 (5%), a 37^o C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 10µL de solução tampão para citometria, Fac´sFlow (BD). A análise da marcação com a Rodamina 123 nas células hepáticas foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (BD) pela aquisição de 10.000 eventos. Os dados foram analisados pelo programa Win MDI 2.8.

Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

As amostras das células nos diferentes períodos gestacionais foram centrifugadas e ressuspendidas em álcool 70% e álcool RNAse, respectivamente. O tubo foi centrifugado à 1500rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado tampão FACsFlow, transportando a suspensão para tubos de citometria, acrescentando o anticorpo específico da diferenciação e maturação de células mesenquimais incubado por 15 minutos a 4º C e analisadas em Citômetro de Fluxo FACSCalibur em 10.000 eventos utilizando o programa CELLQUEST. A expressão de

marcadores de membrana foi determinada pela comparação com um isótopo controle analisada em histograma.

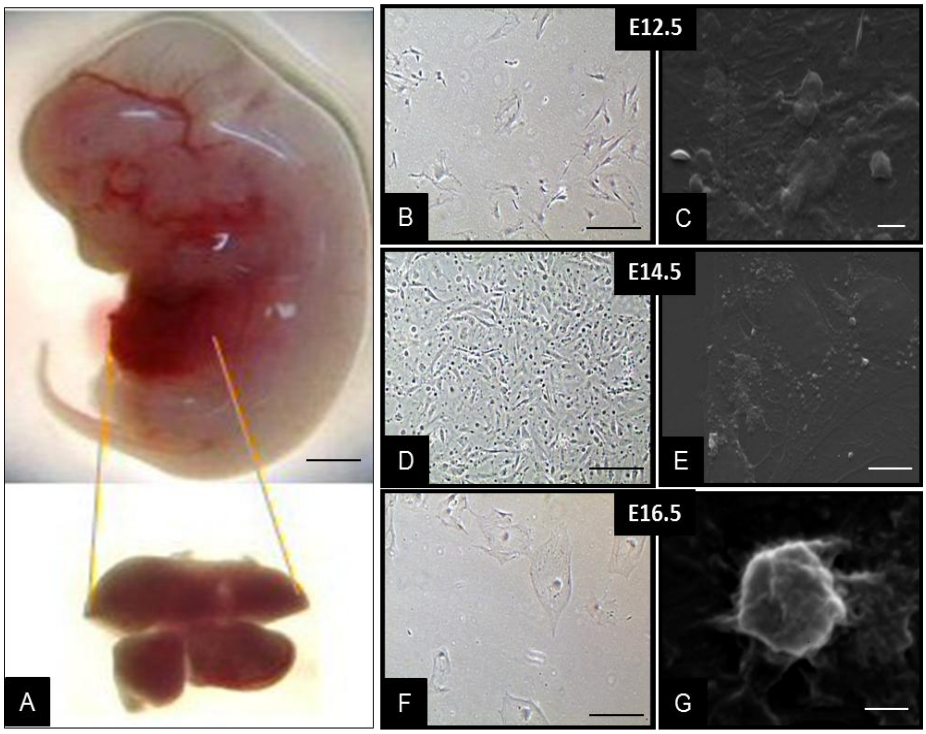
Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo método de Variância ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de TUKEY-KRAMER. Os valores foram expressos em média ± desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p<0.05$.

RESULTADOS

Os embriões E12.5 possuiam um tamanho que proporcionava o adequado isolamento do broto hepático. O broto hepático do E12.5 já se encontrava como 4 pequenos segmentos, sendo encontrado 2 segmentos em cada lado, entretanto sua forma não se assemelhava com a de um fígado adulto (Figura 1A). Os brotos hepáticos dos fetos E14.5 e E16.5 já apresentavam sinais de lobação.As células utilizadas para análise na microscopia eletrônica de varredura foram nos 3 períodos gestacionais estudado e na 5º passagem. No cultivo de E12.5 haviam células aderidas à placa de cultura com formato fusiformes e com células em divisão celular. No período de E14.5 as células do broto hepático apresentavam-se em maior densidade, com numerosas células com brotamentos e em divisão celular, como também se observou a síntese e organização da matriz extracelular. As células do broto hepático E16.5 apresentaram-se firmemente aderidas a superfície da placa de cultura com organização e maturação das fibras da matriz extracelular, que possibilitaram a evidenciação das interações, conexões e funções entre as células recém-proliferadas. O aspecto geral demonstrou células com maior grau de maturação e diferenciação celular (Figura 1B-G).

Figura 1 - Imagem fotográfica (A) do broto hepático E14.5 dias e fotomicrografia das células em cultura do broto hepático E12.5 (B-C), E14.5 (D-E) e E16.5 (F-G) dias de gestação. As imagens das culturas celulares (B-D-F) foram obtidas através de microscópio óptico de inversão, na objetiva de 20x, e as imagens (C-E-G) foram obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, com o aumento de (C) 10µm e (E e G) 3 µm

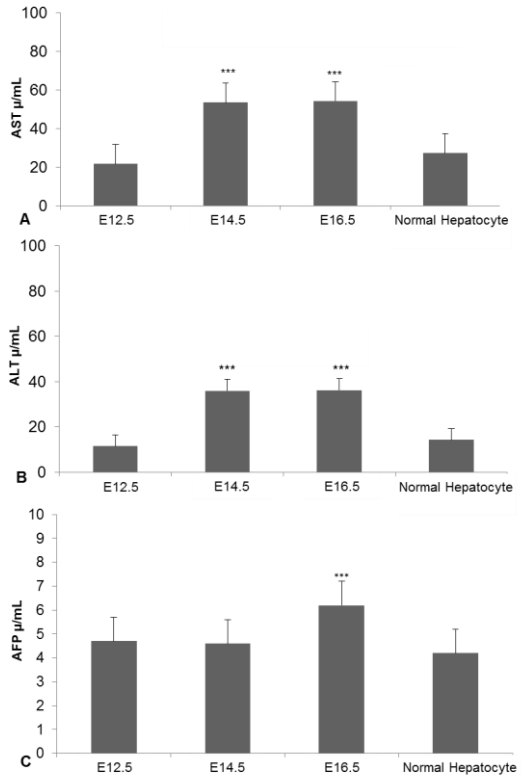


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

As fotomicrografias em hematoxilina-eosina das células do broto hepático dos embriões e fetos demonstraram morfologia celular fusiforme do tipo *fibroblastlike cells* nos diferentes períodos analisados. As células isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide, com núcleo delimitado, com 2 ou 3 nucléolos evidentes, e citoplasma com limites imprecisos. Apresentaram formação de monocamada ou "tapete celular" após atingirem 90% de confluência.

Os resultados de determinação de enzimas hepáticas demonstraram que a concentração de ALT, AST e AFP foram significativamente menores no período de E12.5 quando comparadas aos demais períodos (Figura 2).

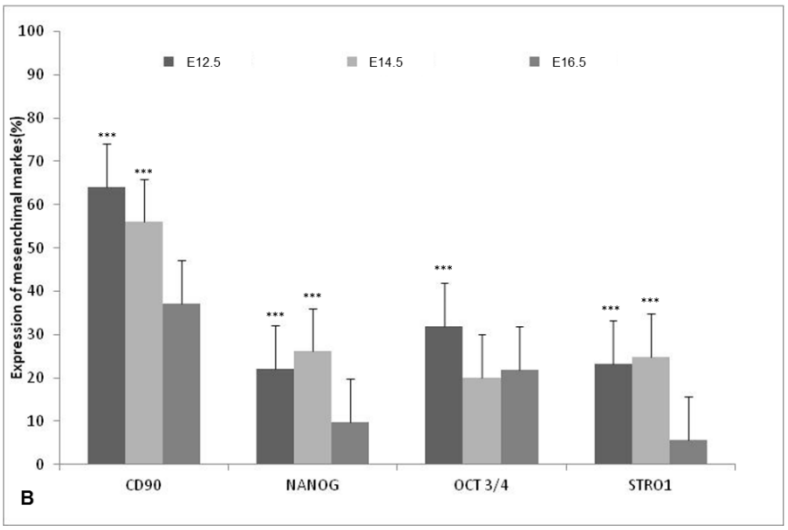
Figura 2 - Gráfico de barras representando os valores de média ±DP para TGO (A), TGP (B) e AFP (C) (µ/mL) nas células do broto hepáticos nos diferentes dias de gestação em comparação ao hepatócito de rato normal. *** Diferença significativa– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey (α≤0,05)



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

A expressão dos marcadores CD90 mostrou-se aumentado em todos os períodos mantidas em cultura até a 5ª passagem. O marcador NANOG mostrou-se diferencialmente expresso no período de E14.5 dias até E16.5 em comparação aos demais períodos. Por outro lado, o marcador OCT3/4 mostrou-se aumentado significativamente no período de E16.5. Já o marcador STRO1 não se mostrou diferencialmente expresso em nenhum período analisado (Figura 3).

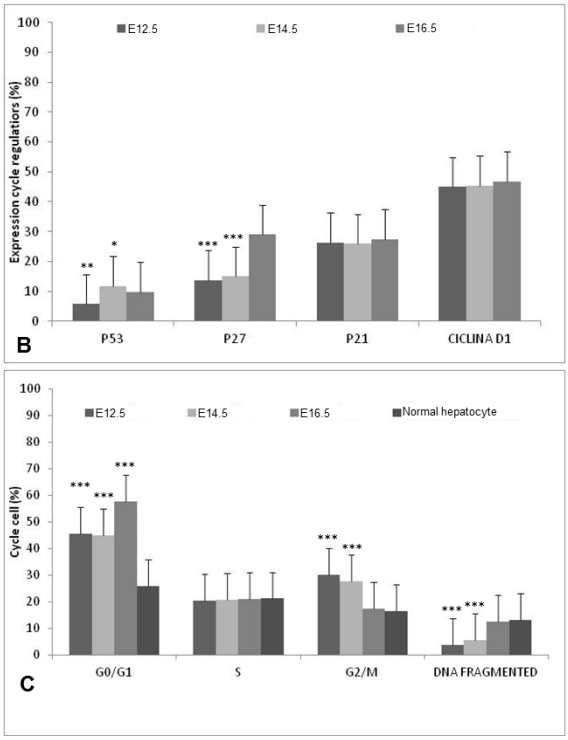
Figura 3 - (A) Gráfico de barras representando os valores de média ± DP para os marcadores de células mesenquimais expressos em células do broto hepático nos diferentes dias de gestação obtidos por citometria de fluxo. *** Diferenças estatísticas– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey ($\alpha \leq 0,05$)



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Em relação à expressão das proteínas que funcionam como supressores e regulam a progressão do ciclo celular, a expressão da P21 estava sobre o controle da P53, enquanto que a P27 ao ser expressa suprimiu o crescimento celular, provocando desta forma a parada do ciclo celular no ponto de restrição G1-S. Os resultados obtidos demonstraram baixa expressão na P53, expressão invariável da P21 e aumento da expressão da P27 significativamente no período de E16.5. O significado biológico deste resultado demonstra supostamente, que a diferenciação das células derivadas do broto hepático restringiu a parada do ciclo celular da expressão da P53. A expressão da Ciclina D1 é essencial para a progressão das células através da fase G1 do ciclo celular. Sua expressão foi invariável nos três períodos analisados (Figura 4).

Figura 4 - (B) Gráfico de barras representando os valores de média ± DP para os marcadores de ciclo celular; (C) Gráfico de percentual de células do broto hepático em cada fase do ciclo celular, nos diferentes períodos gestacionais. *** Diferenças estatísticas– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey (α≤0,05)

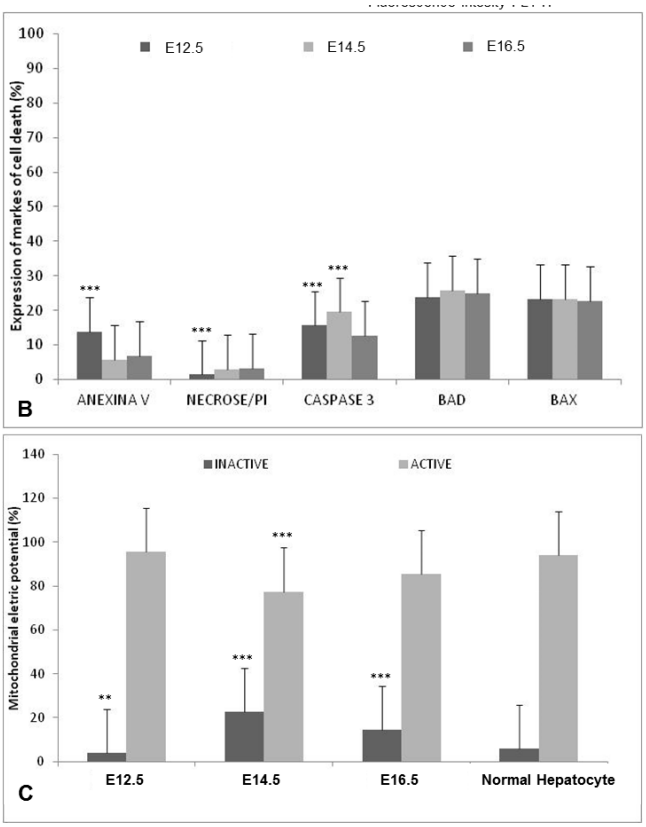


Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

A determinação da quantidade de células mortas por apoptose ou necrose, foi determinada pela expressão dos marcadores Anexina V/PI e as vias de apoptose pela expressão das proteínas pró e anti-apoptóticas Bax, Bad, Bcl-2 e das cisteína protease Caspase-3 fosforilada. Nossos resultados mostraram que as células do broto hepático não expressaram significativamente nenhuma dessas proteínas pró apoptóticas bem como, anexina V. A expressão da caspase que sinaliza a apoptose, cliva o substratos com resíduos de aspartato. A caspase-3 ativada em células nos diferentes períodos de gestação, demonstraram que não houve alteração significativa em sua expressão (Figura 5).

Na análise das mitocôndrias ativas e inativas da Rodamina-123, nos períodos de gestação de E14.5 e E16.5 observou-se o aumento na proporção de células inativas com menor capacidade funcional ou metabólica, quando comparada ao período de E12.5 ou mesmo em relação ao hepatócito maduro.

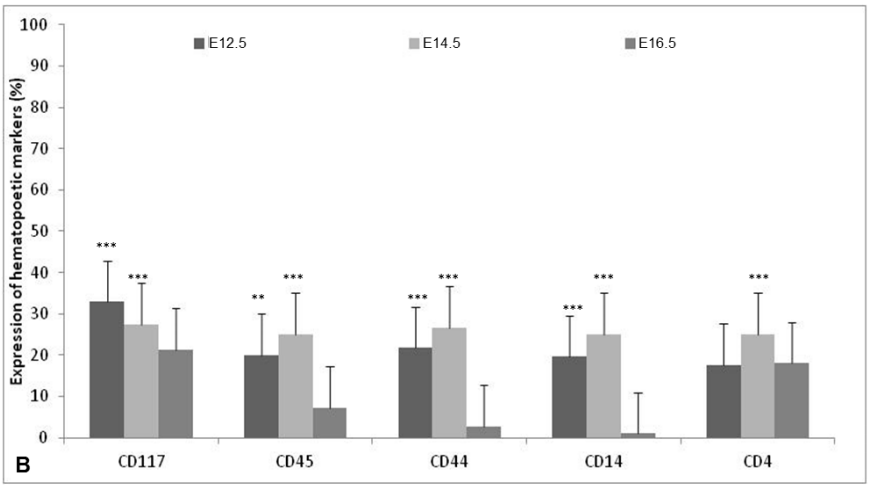
Figura 5 - (B) Gráfico de barras representando os valores de média ± DP para os marcadores de vias de morte celular programada (apoptose) e necrose; (C) Gráfico de percentual de mitocôndrias ativas e inativas expressos em células do broto hepático nos diferentes períodos gestacionais. *** Diferenças estatísticas– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey (α≤0,05)



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Na análise com os marcadores hematopoiéticos, percebe–se maior expressão nos períodos E12.5 e E14.5, comparado ao período E16.5. Os dados dos valores médios ± DP estão apresentados na Figura 6. Os histogramas representativos adquiridos pelo citômetro pelo programa *Cell Quest* e analisados pelo programa *WInMdi.*2.9.

Figura 6 - (B) Gráfico de barras representando os valores de média ± DP para os marcadores hematopoiéticos expressos em células do broto hepático nos diferentes períodos gestacionais. *** Diferenças estatísticas– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey (α≤0,05).



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

Foram realizadas análises das diferentes fases do ciclo celular das células do broto hepático e do hepatócito de rato normal e do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram acúmulo na fase G0/G1, repercutindo na modulação da capacidade de proliferação e aumento na proporção de células com DNA fragmentado, nas células no período de 16,5 dias em comparação aos demais períodos e ao hepatócito normal. O aumento da fragmentação do DNA em média foi de 3,5 e 2,3 vezes, respectivamente nos períodos E12.5 e E14.5. A capacidade de síntese e de divisão celular (G2/M) das células do broto hepático foi constante em todos os períodos de gestação. As correlações estatísticas e os histogramas representativos (Tabela 1) demonstraram claramente as modificações nas proporções de células com potencial proliferativo inversamente proporcional ao DNA fragmentado, nos diferentes períodos de gestação em comparação ao hepatócito normal.

Tabela 1- Valores de média e desvio padrão das diferentes fases do ciclo celular das populações de células do broto hepático de ratos Fischer 344, nos diferentes dias de gestação obtido por citometria de fluxo.

Dias de obtenção das células-tronco de broto hepático	**GO/G1** Média ± DP	**Fase S** Média ± DP	**G2/M** Média ± DP	**DNA fragmentado** Média ± DP
E12.5	45,6 ± 3,9 **	20,4 ± 2,6	30,1 ± 1,7	3,5 ± 1,2 **
E14.5	44,9 ± 3,8 **	20,5 ± 2,6	27,5 ± 3,0	5,5 ± 1,3 **
E16.5	57,7 ± 4,3 **	20,8 ± 2,6	17,3 ± 2,4	12,5 ± 2,0 ***
Hepatócitos normais	25,9 ± 3,4	21,1 ± 1,9	16,3 ± 1,5	13,1 ± 1,2

Legenda: DP= Desvio Padrão. *** Diferenças estatísticas– Teste de Variância de ANOVA, post test Tukey ($\alpha \leq 0{,}05$).

Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

DISCUSSÃO

As células em cultura mantêm o seu genoma e os mecanismos fundamentais de proliferação e do ciclo celular, representando um modelo para avaliação de diversos testes celulares e bioquímicos, substituindo o modelo animal. A metodologia de cultura celular emprega um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas de diferentes fontes, mantendo suas características funcionais e metabólicas próprias (GOLDBERG; MCCULLEY, 1987). Portanto, cada informação genética preservada é inerente a um único genoma, sendo uma particularidade avaliada no modelo desenvolvido neste estudo, no qual as células embrionárias e fetais do broto hepático de ratos Fischer 344 foram submetidas e mantiveram estaveis nos marcadores utilizados para sua caracterização.

Neste estudo foram utilizadas amostras de broto hepático derivados de embriões E12.5 e fetos E14.5 e E16.5, idades consideradas por Kaufmann (1999) como embriões (12.5 dias de gestação) e fetos a partir de 14.5 dias de gestação.

As células do broto hepático de ratos Fischer mantidas em cultura demonstraram aspecto de *fibroblast like cell*, com a capacidade de sintetizar e organizar uma matriz extracelular com elementos proteicos fibrilares que aumentaram sua organização em culturas de E16.5. As análises realizadas em microscopia eletrônica de varredura mostram a organização tridimensional da matriz extracelular secretada pelas células tronco mesenquimais do broto hepatico, mantidas em cultura nos tres periodos embrionários. As culturas realizadas com fetos E16.5 demonstraram que a matriz se organiza de forma a estabelecer conexões importantes para o estabelecimento de uma rede de suporte e sustentação fibrilar para diferenciação celular.

Nas análises bioquímicas de ALT e AST, observamos que as concentrações se mostraram mais expressas nos períodos E14.5 e E16.5. Esses marcadores são mais utilizados

para a verificação de citólise hepática, sendo um marcador específico de dano hepático, corroborando com os dados de Cai et al. (2015). Em contrapartida, observamos a expressão de AFP maior no período E16.5. Esse marcador é utilizado como um indicador de especificidade hepática durante a cultura de diferenciação. Um elevado nível na produção de AFP sugere fortemente que as células diferenciadas foram células de hepatócitos fetais semelhantes ao relatado por Ishikawa et al. (2015).

O marcador de células mesenquimais CD90, se mostrou signitificamente expressos em E12.5. A positividade de CD90 esta preservada entre as células-tronco mesenquimais isoladas de muitas epécies de animais diferentes (DAVIES et al. 2001). O CD90 é visto como um fator de pluripotência de células estamais com poder de auto-renovação, evidenciando o poder mesenquimal das células embrionárias do broto hepático de E12.5.

A indução de pluripotência em fibroblastos primários humanos pela transdução dos genes OCT3/4, c-Myc, KLF4 e SOX2 em vetores virais espécie-específicos demonstraram a capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em tecidos derivados dos três folhetos embrionários (DALEY, 2010). Neste estudo os marcadores utilizados foram utilizados como objeto para a transdução e indução de células-troncos derivadas do broto hepático, o conjunto de marcadores expressos nas células derivadas do broto hepático corroborou para sua possível capacidade de pluripotência.

Nos três períodos de cultura das células do broto hepático (E12.5, E14.5 e E16.5), a expressão de NANOG foi pequena e ao longo do cultivo ocorreu uma diminuição significativa deste marcador, tal fato deve estar relacionado ao seu potencial grau de maturidade demonstrado em blastocisto por Constantinescu et al. (2004).

A expressão de P53, P21, P27 e Ciclina D1 associadas a quantidade de DNA fragmentado, células em apoptose e a quantidade da Caspase 3 foforilada, confirmam a estabilidade destas células quando mantidas em cultura, apresentando propriedades de células-tronco com potencial para serem utilizadas para fins terapêuticos. Esses resultados *in vitro* indicam que estas células não são transformadas e supostamente não desenvolvem tumores em animais imunodeficientes. No período E16.5 notamos uma maior marcação de P27, com um aumento de DNA fragmentado e parada do ciclo, o que evidencia uma maior morte de células neste período gestacional.

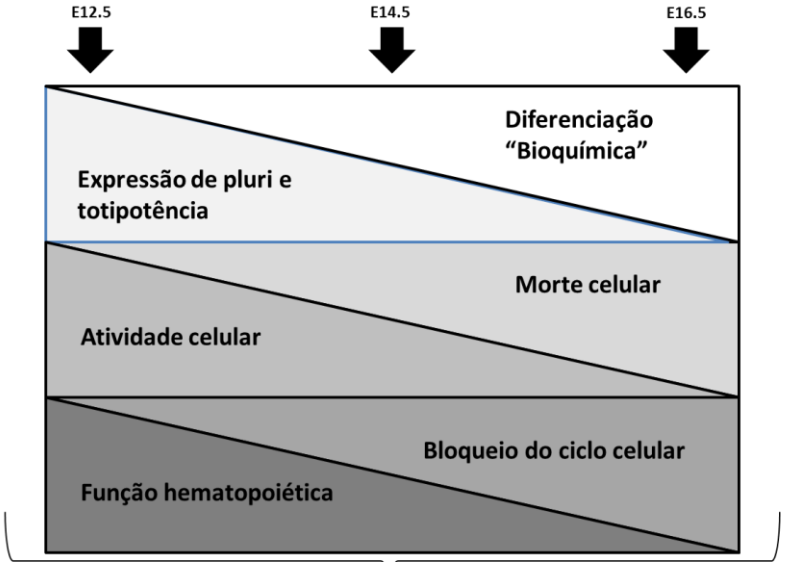
As células derivadas do broto hepático demonstraram aumento na atividade funcional e metabólica no fluxo de elétrons em mitocôndrias em E12.5, avaliados pelo potencial elétrico mitocondrial com sonda fluorescente rodamina 123, em comparação aos demais períodos, e se mostram efetivamente produtoras de radicais livres lipoperoxidados no período E16.5. Estes

resultados em suma, corroboram aos achados da quantidade de DNA fragmentado e na expressão de P27, como regulador negativo da progressão do ciclo celular, em células E16.5, o que reflete o seu diferencial estágio de maturação.

A maior expressão dos marcadores hematopoiéticos CD117, CD45, CD44 e CD14, nos períodos E12.5 e E14.5, são um indicativo que nestes períodos, o broto hepático desenvolva a função da medula óssea, mostrando seu potencial hematopoiético até que se forme o fígado maduro. O fígado embrionário representa o maior sítio de hematopoiese durante o desenvolvimento embrionário. Nos ratos, o broto aparece aos 10 dias de gestação. Coincidente com a maturação da medula óssea e do baço, as células saem do fígado para suas destinações finais, enquanto o fígado inicia a organização de sua estrutura e desenvolve numerosas funções metabólicas tornando-se maduro (GOTTINGEN, 2006).

Com base em nossos resultados, observamos que as células do broto hepático E12.5, se mostraram com maior potencial para serem utilizados em estudos relacionados a medicina regenerativa, por se tratarem de células derivadas de embriões, com maiores expressões de marcadores mesenquimais e de pluripotência, além da maior atividade celular e a presença de marcadores hematopoiéticos. Se tornando assim, uma melhor opção no tratamento de doenças hepáticas. Assim, métodos mais eficientes e seletivos serão necessários para dirigir a diferenciação das células embrionárias derivadas do broto hepático, para produzir populações de células específicas de maneira homogênea. A figura 7 ilustram os principais achados do presente estudo.

Figura 7. Fluxograma ilustrando os métodos e considerações sobre os achados do presente trabalho.



Fonte: (FERREIRA, A. O., 2016)

CONCLUSÃO

As linhagens de células do broto hepático nos diferentes períodos de gestação obtidas neste trabalho apresentaram grande capacidade proliferativa, mantendo-se pluripotentes principalmente nos períodos E12.5 e E14.5, não apresentando marcadores de transformação neoplásica ou de erros genéticos, que controlam a progressão de crescimento e diferenciação celular normal. Sendo a terapia com células derivadas do broto hepático uma estratégia promissora no tratamento de doenças hepáticas.

REFERÊNCIAS

BAPTISTA, A. B. MORITA, E. L.; PASSOS, C. C.; FERREIRA, A. O.; ALVES, F. R.; ALVES, A. J.; MIGLINO, M. A.; GUERRA, R. R. Efeito da periodicidade na taxa de prenhez em ratos isogênicos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 171-175, 2011.

CAI, Z.; JIANG, X.; PAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, L.; ZHU, K.; CAI, Y.; LING, Y.; CHEN, F.; XU, X.; CHEN, M. Transcriptomic analysis of hepatic responses to testosterone deficiency in miniature pigs fed a high-cholesterol diet. **BMC Genomics**, v. 16, n. 59, p. 1-19, 2015.

CONSTANTINESCU, S. Stemness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. **7**, n. 2, p. 103-112, 2004.

DALEY, G. Q.; LENSCH, M. W.; JAENISCH, R.; MEISSNER, A.; PLATH, K.; YAMANAKA, S. Cell Stem. **Cell**, v. 4, n. 1, p. 200-201, 2010.

DAVIES, S. J.; GROGAN, J. L.; BLANK, R. B.; LIM, K. C.; LOCKSLEY, R. M.; MCKERROW, J. H. Modulation of blood fluke development in the liver by hepatic CD4+ lymphocytes. **Science**, v. 294, n. 5545, p. 1358-1361, 2001.

DUNCAN, S.A. Mechanisms controlling early development of the liver. **Mechanism of Development**, v. 120, n. 1, p. 19-33, 2003.

GOLDBERG, A.; MCCULLEY, J. P. **Alternative methods in toxicology.** New York: Mary Ann Liesbert, 1987. 117p.

GOTTINGEN, G. **Characterization of foetal hepatic cells during rat liver development. Dissertation.** 2006. 205 f. Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen. Fakultäten Georg-August- Universitätzuvorgelegt von Abderrahim Elmaouhoub Aus Rabat, Marokko, 2006.

IRFAN, A.; AHMED, I. Hepatocellular carcinoma: could stem cell therapy ever be a viable solution? **Elective Medicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 273-276, 2014.

KAUFMANN, M. H.; BARD, J. B. L. **The anatomical basis of mouse development**. New York: Academic Press, 1999. 378p.

ISHIKAWA, T.; KOBAYASHI, M.; YANAGI, S.; KATO, C.; TAKASHIMA, R.; KOBAYASHI, E.; HAGIWARA, K.; OCHIYA, T. Human induced hepatic lineage-oriented stem cells: autonomous specification of human iPS cells toward hepatocyte-like cells without any exogenous differentiation factors**. PLoS One**, v. 10, n. 4, e0123193, 2015.

MIN, J. Y.; CHEN, Y.; MALEK, S.; MEISSNER, A.; XIANG, M.; KE, Q.; FENG, X.; NAKAYAMA, M.; KAPLAN, E.; MORGAN, J. P. Stem cell therapy in the aging hearts of Fisher 344 rats: synergistic effects on myogenesis and angiogenesis. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery,** v. 130, n. 2, p. 547-553, 2005.

MURACA, M.; GERUNDA, G.; NERI, D. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. **The lancet**, 359, n. 9303, p. 317-318, 2002.

MURACA, M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, n. 3, p. 180-187, 2008.

MURAOKA, K.; SHINGO, T.; YASUHARA, T.; KAMEDA, M.; YUAN, W.; HAYASE, H.; MATSUI, T.;; MIYOSHI, Y.; DATE, I. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus **Experimental Neurology**, v. 199, n. 3, p. 311-327, 2006.

PASSOS, C. C. Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fisher. 2010. 117 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2010.

SELDEN, C.; HODGSON, H. Cellular therapies for liver replacement. **Transplant Immunology**, v. 12, n. 2, p. 273-288, 2004.