LEANDRO ALMEIDA RUI

**Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o
tratamento de cirrose hepática em ratos *Wistar***

São Paulo
2014

LEANDRO ALMEIDA RUI

**Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o
tratamento de cirrose hepática em ratos *Wistar***

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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dr^a Graciela Conceição Pignatari

São Paulo
2014

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.3017
FMVZ

Rui, Leandro Almeida

Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o tratamento de cirrose
hepática em ratos *Wistar* / Leandro Almeida Rui. -- 2014.
137 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dr^a. Graciela Conceição Pignatari.

1. Fibrose hepática. 2. Cirrose hepática. 3. Tioacetamida. 4. Células-tronco. 5. Membrana Amniótica.
I. Título.

ERRATA

RUI, L. A. Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o tratamento de cirrose hepática em ratos Wistar. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Folha de rosto	2º	Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em [...].	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em [...].
Folha de avaliação	2º	Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em [...]	Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em [...].
RESUMO	1º	Tese (Mestrado em Ciências) [...]	Dissertação (Mestrado em Ciências) [...]
ABSTRACT	1º	Tese (Mestrado em Ciências) [...]	Dissertação (Mestrado em Ciências) [...]

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco de membrana amniótica de ratos para o tratamento da cirrose hepática em ratos Wistar", protocolado sob o nº 2599/2012, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade da Dra. Graciela Conceição Pignatari, 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 e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Evaluation of cellular therapy with rat amniotic membrane stem cells to treat hepatic cirrhosis in Wistar rats", protocol number 2599/2012, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Dra. Graciela Conceição Pignatari, 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 and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 11 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUI, Leandro Almeida

Título: Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o tratamento de cirrose hepática em ratos *Wistar*

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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos **animais**, por terem permitido a condução desta pesquisa, e por permearem este mundo com o mais puro sentimento, ainda que possamos não merecê-lo;

À **minha família**, por toda a dedicação e confiança em minha carreira e meu trabalho, e pelo amor e apoio incondicional em todas as fases de minha vida. Essa conquista também pertence a vocês, **Romano Terêncio Rui, Maria Cristina de Almeida Rui, Lázara de Almeida, Lauro Moraes de Almeida**;

Ao **Felipe de Oliveira Pessoa**, por ter me mostrado um novo significado para a palavra AMOR, se tornado parte de minha família, e ter me dado forças e alegrias para superar esta etapa;

A todos meus **amigos** presentes em minha vida, e por todas as batalhas travadas juntos. Em meio a lágrimas e sorrisos, sempre estiveram ao meu lado.

A todos os **mestres** que me ajudaram a construir os pilares do conhecimento sobre o qual este trabalho foi realizado.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Graciela Conceição Pignatari**, por todos os ensinamentos e confiança depositada em mim nesta longa etapa, e sobretudo pela paciência em me ensinar um pouco mais sobre a perseverança, a humildade e a convivência;

À minha co-orientadora, **Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga**, por todo o carinho e conhecimento transmitido ao longo desses anos, e pela imensa vontade de ensinar;

À minha ex-orientadora e amiga, **Elizangela dos Anjos Silva**, por toda a amizade, dedicação, confiança, e sobretudo por ser essa pessoa maravilhosa com um enorme desejo em ajudar ao próximo;

A todos os amigos, colegas e ex-colegas do **Laboratório de Células-Tronco**, por todos os momentos vividos juntos, e por todo o apoio na aquisição desta vitória: **Caroline Pinho Winck, Fabiele Baldino Russo, Isabella Rodrigues Fernandes, João Leonardo Rodrigues Mendonça Dias, Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães, Marcos Vinícius Mendes Silva, Mariah Munhoz Evangelinellis, Raphael Marques de Almeida Rosa da Cruz, Sílvia Amélia Ferreira Lima, Sílvia Daniela Ramos**.

À chefe do departamento, **Maria Angélica Miglino**, por ter me aceitado neste programa, e permitido que toda essa pesquisa acontecesse;

Aos técnicos e funcionários do **Setor de Anatomia**, por todo o auxílio e atenção prestada, e paciência em transmitir o conhecimento, **Diogo Palermo, Edinaldo Ribas Farias, Jaqueline Martins de Santana, Maycon Barbosa da Silva, Ronaldo Agostinho da Silva, Rose Eli Grassi Ricci**

A todos os professores e técnicos do **Departamento de Patologia**, pelo apoio, pelos ensinamentos e pela permissão de uso da infraestrutura para concretização deste experimento – **Cláudia Madalena Cabrera Mori, Maria Lúcia Zaidan Dagli, Marguíti Isaura Soares Silva, Paulo César Maiorka**.

Ao laboratório **Canis Felis Diagnóstico Veterinário**, e pela grande atenção e ajuda prestada nas análises bioquímicas pela **Aline de Mello Cruz**

A todos os amigos que me apoiaram em todas as etapas de minha vida, e um agradecimento especial ao **Marcelo Noronha Veloso** pela dedicação nas análises estatísticas;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo financiamento;

À toda **FMVZ/USP** pelos anos de casa e por toda a história nela vivida.

RESUMO

RUI, L. A. **Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o tratamento de cirrose hepática em ratos *Wistar***. [Evaluation of cell therapy using mesenchymal stem cells for treatment of liver cirrhosis in *Wistar* rats.]. 2014. 137 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A cirrose hepática é uma doença crônica e irreversível com modificações histológicas caracterizadas por nódulos de regeneração e desarranjo de hepatócitos, com aumento difuso de tecido conjuntivo e perda de função. As células-tronco têm sido amplamente estudadas para o tratamento de injúrias hepáticas. Fibrose e cirrose foram induzidas em ratos *Wistar*, através da aplicação de tioacetamida (TAA) intraperitoneal a 200 mg/kg por 8 ou 14 semanas, seguido de terapia celular com aplicação intravenosa única de 1×10^6 células-tronco de membrana amniótica de ratas. Amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas, e tecido hepático para histologia e imunohistoquímica. A histopatologia para colorações de hematoxilina-eosina para graduação e estadiamento da lesão hepática foi realizada, com observação de alterações celulares; picrosírius para quantificação do colágeno parenquimal; ácido periódico-Schiff para mucopolissacarídeos neutros e glicogênio; e alcian blue para mucopolissacarídeos ácidos. Imunohistoquímica foi realizada para marcação de PCNA, colágenos tipo 1 e 3, e α -SMA. O cultivo celular apresentou ótimo crescimento, sendo transduzido com GFP e negativo para micoplasma. Os animais induzidos experimentalmente mostraram baixo ganho de peso durante o experimento, com notável recuperação nas duas primeiras semanas após término da indução. A mortalidade experimental foi de 10 %. A indução da fibrose e cirrose hepática obtiveram sucesso no período de 8 e 14 semanas, respectivamente. Análises macroscópicas mostraram melhor aspecto de fígados cirróticos após terapia celular. Não houve diferenças estatísticas após a terapia celular para as análises bioquímicas, graduação, estadiamento, alterações celulares, proliferação de ductos, mucopolissacarídeos ácidos e neutros e imunohistoquímicas para colágeno 1 e 3, PCNA e α -SMA. Houve, porém, uma tendência a melhora na graduação e estadiamento da fibrose e cirrose com redução da atividade necroinflamatória; redução na proliferação de ductos; menor deposição de mucopolissacarídeos ácidos e neutros; diminuição das alterações celulares com indicativos de menor grau de lesão tecidual e maior grau de regeneração; diminuição da expressão de α -SMA e colágenos 1 e 3; e aumento do PCNA. O colágeno intralobular teve diminuição após terapia celular em fígados fibróticos. Em animais induzidos a cirrose, houve diminuição de ambos colágenos interlobular e intralobular. Conclui-se que houve uma

tendência de melhora dos animais após tratamento com células-tronco da membrana amniótica de ratas, o que nos encoraja a aplicação de protocolos de terapia celular. Apesar dos resultados promissores, um maior número de animais precisa ser testado para que se tenham mais dados, que possam dar subsídios para o uso destas células na prática clínica para o tratamento da cirrose hepática.

Palavras-chave: Fibrose hepática. Cirrose hepática. Tioacetamida. Células-tronco. Membrana Amniótica.

ABSTRACT

RUI, L. A. **Evaluation of cell therapy using mesenchymal stem cells for treatment of liver cirrhosis in Wistar rats.** [Avaliação da terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais para o tratamento de cirrose hepática em ratos *Wistar*]. 2014. 137 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Liver cirrhosis is a chronic and irreversible disease with histological changes characterized by regenerative nodules and disarray of hepatocytes with diffuse increase in connective tissue and loss of function. Stem cells have been extensively studied for the treatment of liver injury. Fibrosis and cirrhosis was induced in *Wistar* rats by application of thioacetamide (TAA) intraperitoneally at 200 mg/kg for 8 or 14 weeks, followed by cell therapy with a single intravenous administration of 1×10^6 stem cells from amniotic membrane of rats. Blood samples were collected for biochemical analyzes, and liver tissue for histology and immunohistochemistry. Histopathology by hematoxylin-eosin for grading and staging of hepatic injury with observation of cellular changes was performed; picrosirius for quantification of parenchymal collagen; periodic acid-Schiff for neutral mucopolysaccharides and glycogen; and alcian blue for acid mucopolysaccharides. Immunohistochemistry was performed for PCNA, type 1 and 3 collagens, and α -SMA. Cell culture showed optimal growth, being transduced with GFP and negative for mycoplasma. Animals induced to liver disease showed low weight gain during the experiment, with remarkable recovery in the first two weeks after completion of induction. Experimental mortality was 10%. Induction of fibrosis and cirrhosis was successful after the period of 8 and 14 weeks, respectively. Macroscopic analysis showed improvement in the aspect of cirrhotic livers after cell therapy. There were no statistical differences after cell therapy for biochemical analyzes, grading, staging, cellular changes, proliferation of ducts, acidic and neutral mucopolysaccharides and immunohistochemistry for collagen 1 and 3, PCNA and α -SMA. There was, however, a tendency on improvement in grading and staging of fibrosis and cirrhosis with reduced necroinflammatory activity; reduction in the proliferation of ducts; lower deposition of acidic and neutral mucopolysaccharides; decrease in cellular changes indicating a lower degree of tissue damage and a greater degree of regeneration; decreasing on the expression of α -SMA and type 1 and 3 collagens; and increased PCNA. Intralobular collagen decreased after cell therapy in fibrotic livers. In cirrhotic animals, there was a decrease of both interlobular and intralobular collagen. We conclude that was a trend to improvement of animals after treatment with stem cells derived from amniotic membrane of rats, which encourages the application of

cell therapy protocols. Despite the promising results, a larger number of animals must be tested, so we can have more data to make allowances for the use of these cells in clinical practice for the treatment of liver cirrhosis.

Keywords: Liver fibrosis. Liver cirrhosis. Thioacetamide. Stem cells. Amniotic Membrane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do fígado do rato	25
Figura 2 - Lóbulo hepático	27
Figura 3 - Esquema representativo da iniciação e manutenção da fibrogênese	33
Figura 4 - Atuação do TGFβ-1 no processo de ativação das células estreladas e desenvolvimento de fibrose	39
Figura 5 - Origem das células-tronco de membrana amniótica	49
Figura 6 - Desenho experimental	56
Figura 7 - Método de coleta de sangue pela veia da cauda em ratos	60
Figura 8 - Fotomicrografias de cultivo celular de membrana amniótica de rata	70
Figura 9 - Fotomicrografia das células-tronco de membrana amniótica de ratas transduzidas carregando o gene EGFP por microscopia óptica de fluorescência utilizando os filtros DAPI e FITC	71
Figura 10 - Macroscopia dos fígados dos animais após o período de indução experimental	72
Figura 11 - Fotomicrografias de fígados submetidos a fibrose e cirrose hepática, pela coloração de hematoxilina-eosina	74
Figura 12 - Fotomicrografias de fígados submetidos a fibrose e cirrose hepáticas, pela coloração de Picrosírius	75
Figura 13 - Macroscopia dos fígados dos animais após o período de 90 dias pós-terapia ...	77
Figura 14 - Fotomicrografias de alterações celulares observadas em tecido hepático de diferentes animais submetidos a indução de fibrose e cirrose, pela coloração de HE, indicadas por setas	86
Figura 15 - Fotomicrografia de tecido hepático indicando proliferação de ductos biliares ...	93
Figura 16 - Fotomicrografias destacando mucopolissacarídeos ácidos visualizados pela coloração de Alcian Blue	95
Figura 17 - Fotomicrografias destacando mucopolissacarídeos neutros e glicogênio visualizados pela coloração de ácido periódico-Schiff	96
Figura 18 - Fotomicrografias destacando colágeno parenquimal em fígado cirrótico pela coloração de Picrosírius	98

Figura 19 - Marcações imunohistoquímicas para tecido hepático de animais submetidos à cirrose hepática	101
--	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Índice de atividade histológica (IAH) e escores de graduação da fibrose e cirrose hepática	65
Quadro 2 - Escores para estadiamento da fibrose/cirroses hepáticas, de acordo com a expansão do colágeno	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Pesos dos animais submetidos a 8 semanas de experimentação	78
Gráfico 2 -	Peso dos animais submetidos a 14 semanas de experimentação.....	79
Gráfico 3 -	Análises bioquímicas dos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepáticas	82
Gráfico 4 -	Graduação dos animais induzidos a fibrose e cirrose hepática, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995).....	85
Gráfico 5 -	Estadiamento dos animais induzidos a fibrose e cirrose hepática, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995).....	85
Gráfico 6 -	Alterações celulares observadas nos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepática	90
Gráfico 7 -	Proliferações de ductos observadas em grupos induzidos à fibrose e cirrose hepática.....	94
Gráfico 8 -	Mucopolissacarídeos ácidos nos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepática.....	97
Gráfico 9 -	Mucopolissacarídeos neutros nos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepática	98
Gráfico 10 -	Proporção volumétrica do colágeno interlobular depositado no tecido hepático de animais submetidos a fibrose/cirrose hepática, após terapia celular	100
Gráfico 11 -	Proporção volumétrica do colágeno intralobular depositado no tecido hepático de animais submetidos a fibrose/cirrose hepática, após terapia celular	100
Gráfico 12 -	Expressão da marcação de PCNA, α -SMA, colágeno 1 e colágeno 3 em tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análises bioquímicas dos diferentes grupos experimentais em diversos momentos	81
Tabela 2 -	Graduação e Estadiamento da fibrose e cirrose hepáticas, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995)	84
Tabela 3 -	Alterações celulares observadas em diferentes grupos experimentais	89
Tabela 4 -	Proliferações de ductos observadas em diferentes grupos experimentais	94
Tabela 5 -	Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros em diferentes grupos experimentais ...	97
Tabela 6 -	Proporção volumétrica do colágeno inter e intralobular	99
Tabela 7 -	Valores da expressão de PCNA, α -SMA, colágeno 1 e colágeno 3	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	alfa-actina de músculo liso
ALB	Albumina
ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CCl ₄	Tetracloreto de carbono
cDNA	DNA complementar
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMN	Dimetilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FA	Fosfatase Alcalina
EGFP	<i>Enhanced Green fluorescent protein</i>
GGT	Gama-glutamil transferase
GLOB	Globulina
hAEC	Células epiteliais de membrana amniótica
hAMSC	Células mesenquimais estromais de membrana amniótica
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HSC	Célula estrelada hepática
IAH	Índice de atividade histológica
IL	Interleucina
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MMP	Metaloproteinase
MSC	Célula-tronco mesenquimal
PAI	Inibidor do fator ativador de plasminogênio

PAS Ácido periódico-Schiff

PBS Tampão fosfato-salino

PCNA *Proliferation cell nuclear antigen*

PCR Reação em cadeia da polimerase

PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas

PT Proteínas totais

TAA Tioacetamida

TBIL Bilirrubina total

TIMP Inibidor tecidual de metaloproteinase

TGF- α Fator de crescimento transformante alfa

TGF- β Fator de crescimento transformante beta

TGO Transaminase glutâmico oxalacética

TGP Transaminase glutâmico pirúvica

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

tPA Ativador de plasminogênio tecidual

uPA Uroquinase ativadora de plasminogênio

VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

α = alfa

β = beta

γ = gama

λ = lambda

μ = mu

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISIOLOGIA HEPÁTICA	25
2.2 REGENERAÇÃO HEPÁTICA	29
2.3 FIBROSE E CIRROSE HEPÁTICAS	31
2.4 BIOQUÍMICA HEPÁTICA	34
2.5 MATRIZ EXTRACELULAR E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS	37
2.6 GENES MODULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR	40
2.7 PCNA	42
2.8 MODELOS DE CIRROSE HEPÁTICA	43
2.9 TERAPIA CONVENCIONAL DA CIRROSE HEPÁTICA	45
2.10 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	47
2.11 CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA	48
2.12 TERAPIA CELULAR	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA	54
3.2 ANIMAIS	55
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E INDUÇÃO DA CIRROSE HEPÁTICA	55
3.4 TERAPIA CELULAR	57
3.4.1 Animais	57
3.4.2 Preparo das Células	57
3.4.3 Terapia Celula	58
3.5 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS APÓS TERAPIA CELULAR UTILIZANDO AS CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	58
3.5.1 Coleta de Sangue e Análise Bioquímica	58
3.5.2 Análise Macroscópica do Fígado	61

3.6 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS	61
3.6.1 Hematoxilina-Eosina (H.E.)	62
3.6.2 Picrosírius	62
3.6.3 <i>Alcian Blue</i>	63
3.6.4 Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.).....	63
3.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	63
3.7.1 Estadiamento e Graduação da Cirrose	63
3.7.2 Análise das Alterações Celulares.....	66
3.7.3 Proliferação de Ductos.....	67
3.7.4 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros	67
3.7.5 Morfometria do Colágeno Parenquimal.....	67
3.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	68
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4 RESULTADOS	70
4.1 CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE RATA	70
4.2 ANÁLISE DOS ANIMAIS APÓS INDUÇÃO DA FIBROSE/CIRROSE	71
4.2.1 Análise Macroscópica	71
4.2.2 Análise Histopatológica da Indução da Fibrose e Cirrose Hepáticas	73
4.3 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR.....	76
4.3.1 Análise Macroscópica	76
4.3.2 Pesagem dos Animais.....	78
4.3.3 Mortalidade	79
4.3.4 Análises Bioquímicas	79
4.3.5 Estadiamento e Graduação da Fibrose/Cirrose Após Terapia Celular.....	84
4.3.6 Alterações Celulares	86
4.3.7 Proliferação de Ductos.....	93
4.3.8 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros	95
4.3.9 Morfometria do Colágeno Parenquimal.....	98
4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	100

5 DISCUSSÃO..... 104

6 CONCLUSÕES..... 112

REFERÊNCIAS..... 113

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISIOLOGIA HEPÁTICA	25
2.2	REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	29
2.3	FIBROSE E CIRROSE HEPÁTICAS	31
2.4	BIOQUÍMICA HEPÁTICA	34
2.5	MATRIZ EXTRACELULAR E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS	37
2.6	GENES MODULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR	40
2.7	PCNA	42
2.8	MODELOS DE CIRROSE HEPÁTICA	43
2.9	TERAPIA CONVENCIONAL DA CIRROSE HEPÁTICA	45
2.10	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	47
2.11	CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA	48
2.12	TERAPIA CELULAR	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA	54
3.2	ANIMAIS	55
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E INDUÇÃO DA CIRROSE HEPÁTICA.....	55
3.4	TERAPIA CELULAR.....	57
3.4.1	Animais.....	57
3.4.2	Preparo das Células.....	57
3.4.3	Terapia Celular.....	58
3.5	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS APÓS TERAPIA CELULAR UTILIZANDO AS CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA	58

3.5.1 Coleta de Sangue e Análise Bioquímica.....	58
3.5.2 Análise Macroscópica do Fígado.....	61
3.6 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS	61
3.6.1 Hematoxilina-Eosina (H.E.).....	62
3.6.2 Picrosírius.....	62
3.6.3 Alcian Blue	63
3.6.4 Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.)	63
3.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS	63
3.7.1 Estadiamento e Graduação da Cirrose.....	63
3.7.2 Análise das Alterações Celulares.....	66
3.7.3 Proliferação de Ductos	67
3.7.4 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros.....	67
3.7.5 Morfometria do Colágeno Parenquimal.....	67
3.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	68
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
4 RESULTADOS.....	70
4.1 CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE RATA	70
4.2 ANÁLISE DOS ANIMAIS APÓS INDUÇÃO DA FIBROSE/CIRROSE	71
4.2.1 Análise Macroscópica.....	71
4.2.2 Análise Histopatológica da Indução da Fibrose e Cirrose Hepáticas.....	73
4.3 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR	76
4.3.1 Análise Macroscópica.....	76
4.3.2 Pesagem dos Animais	78
4.3.3 Mortalidade.....	79
4.3.4 Análises Bioquímicas.....	79

4.3.5 Estadiamento e Graduação da Fibrose/Cirrose Após Terapia Celular	84
4.3.6 Alterações Celulares	86
4.3.7 Proliferação de Ductos	93
4.3.8 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros.....	95
4.3.9 Morfometria do Colágeno Parenquimal.....	98
4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	100
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES.....	112
REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

Uma das enfermidades que mais acomete o fígado em seres humanos é a cirrose (ROBBINS; COTRAN; KUMAN, 1996), que se caracteriza por apresentar modificações nos lóbulos hepáticos, principalmente por formação de nódulos de regeneração (ANTHONY et al., 1978) e desarranjo na disposição cordonal dos hepatócitos, formando ilhas irregulares de células hepáticas, circundada por grande quantidade de tecido conjuntivo (MACLACHLAN; CULLEN, 1998).

A hepatite crônica também vem sendo comumente identificada nas diversas raças de cães, (STROMBECK; GRIBBLE, 1978; ANDERSSON; SEVELIUS, 1991; DILL-MACKY, 1995; SEVELIUS, 1995; FUENTEALBA et al., 1997), sendo uma manifestação clínica de várias etiologias (ROTHUIZEN, 2004). Para os médicos veterinários, ela é considerada uma doença frustrante, devido aos poucos dados publicados referentes a medicamentos ou estratégias terapêuticas para seu tratamento, progredindo inevitavelmente para a cirrose, e ainda com mau prognóstico (WATSON, 2004). Quatro pontos devem auxiliar a melhor compreensão e tratamento da cirrose hepática em cães: compreensão dos mecanismos que associam perda de capacidade regenerativa com fibrose tecidual; conhecimento amplo das etiologias de processos hepáticos agudos e crônicos; predisposição racial e estudo mais abrangente de diversos tratamentos e associações de drogas que poderiam reverter o processo. (WATSON, 2004).

O crescimento progressivo e difuso do tecido conectivo fibroso conduz o fígado a apresentar um aspecto nodular, levando à interrupção da arquitetura geral normal deste órgão, e progredindo para cirrose. Com o avanço da cirrose hepática, ocorrências secundárias podem ocorrer, tais como o aumento da pressão portal, hemorragia visceral, encefalopatia hepática, síndrome hepatorenal, e peritonite bacteriana (HEIDELBAUGH; BRUDERLY, 2006).

Há algumas maneiras de se tratar este processo patológico, dentre as quais a hepatectomia parcial (HASHIMOTO et al., 1998; BARATTA et al., 1996; FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995), podendo estar associada à inibição da enzima conversora de angiotensina pelo lisinopril (RAMALHO et al., 2001); oxigenação hiperbárica (OZDOGAN et al., 2005); transplantação hepática; emprego de células-tronco hepática (TARLÁ et al., 2006); utilização de substâncias com efeito hepatotrófico, tal como vitaminas, aminoácidos, sais minerais, insulina, glucagon, triiodotironina e glicose (PARRA, 1982; PARRA et al., 1992; PARRA et al., 1994; PARRA et al., 1995a; PARRA et al., 1995b); vários fatores com

ação regulatória como as citocinas (IL-6, IL-1 α , e TNF- α) (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997); a terapia gênica ativadora do plasminogênio tipo uroquinase (SALGADO et al., 2006); e a proteína ALR, amplificadora da regeneração hepática (DAYOUB et al., 2006).

Seguindo as considerações éticas, os procedimentos experimentais em humanos são muito limitados, e devido a isto, há uma grande necessidade e importância de se optar pelos modelos animais, uma vez que mimetizam a patologia a ser observada (LALEMAN et al., 2006).

Há vários protocolos preconizados de como se obter modelos experimentais que caracterizem a cirrose hepática através da indução desta injúria por drogas hepatotóxicas, dentre as quais, a utilização de tetracloreto de carbono (CCL₄). Contudo, há um inconveniente: a variação de óbito de 30% durante a indução (LEE; GROSZMANN, 1999). Díaz-Gil et al. (1999) utilizaram esta mesma droga intraperitonealmente e obtiveram cirrose com 11 semanas de indução. A dimetilnitrosamina (DMN) é outra hepatoxina utilizada para indução. Entretanto, é uma droga hepatotóxica, carcinogênica e mutagênica, onde uma extensa fibrose foi alcançada com 3 semanas de aplicação, com uma taxa de óbito em torno de 42% (GEORGE et al., 2001). A dieta de L-aminoácido por deficiência de colina, causa fibrose com 16 semanas, não sendo relatado óbito (SAKAIDA et al., 1998). Ainda temos a tioacetamida (TAA) administrada via oral, que foi utilizada por Laleman et al. (2006), progredindo para quadro cirrótico com 18 semanas, e apresentando óbito de 16%. Já pela injeção dessa droga via intraperitoneal, foi possível obter cirrose com apenas 14 semanas e os autores relataram que a taxa de mortalidade foi bem menor em torno de 4 % (GUERRA et al., 2009).

Estudos demonstram que injúrias hepáticas agudas e crônicas podem potencialmente ser tratadas com transplante de células-tronco (FLOHR et al., 2009). Recentemente, HWANG et al. (2011) demonstraram sucesso com a implantação de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea no tratamento de falência hepática, em um modelo de cirrose hepática induzido por tioacetamida em ratos, após 8 semanas de indução. Neste trabalho os pesquisadores obtiveram ação dessas células em células ovais progenitoras e hepatócitos, e resultando em efeitos terapêuticos variados, tais como: reparo de hepatócitos danificados, restauração do glicogênio intracelular e resolução da fibrose.

Outros trabalhos recentes apontam as células-tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica como uma linhagem promissora no tratamento da cirrose hepática, sendo capazes de se implantar no fígado *in vitro* e se diferenciar na linhagem hepatogênica (TAMAGAWA et al., 2007). Ainda, em estudos envolvendo a cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono em roedores, células derivadas do epitélio de membrana amniótica promoveram redução de citocinas pró-inflamatórias, assim como do colágeno parenquimal e da concentração de células estreladas ativadas, tal como a expressão de marcadores para hepatócitos (MANUELPILLAI et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

Um dos principais objetivos no tratamento da cirrose hepática é a resolução da fibrose; apesar da função hepática ser vital para a sobrevivência, a morbidade da doença hepática crônica é mais frequentemente associada a complicações da hipertensão portal, tal como hemorragia visceral, ascite, e comprometimento renal; e a hipertensão portal está intimamente relacionada com a fibrose hepática (GILCHRIST; PLEVRIS, 2010).

Com base nos dados da literatura, em relação a taxa de mortalidade, neste trabalho utilizamos a tioacetamida, e acredita-se que o período de indução de 8 semanas com TAA é insuficiente para gerar um quadro avançado de cirrose, mas suficiente para uma fibrose (HATAKEYAMA et al., 2002; DEKEL et al., 2003; IIMURO et al., 2003; GNAINSKY et al., 2004) e, portanto, neste estudo, optou-se pela comparação do tratamento de animais em 2 diferentes estágios de indução, de 8 e 14 semanas de aplicação da TAA, tendo como base também o fato de que as células-tronco mesenquimais migram mais facilmente ao local da injúria em lesões agudas (DALAKAS et al., 2004) .

Com isso, neste trabalho, foram utilizadas células-tronco derivadas de membrana amniótica de ratos da mesma espécie, buscando avaliar uma melhora no quadro clínico da doença e, também uma possível regeneração hepática e restauração da arquitetura vascular e nodular do órgão em diferentes estágios de comprometimento do órgão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura, encontram-se descritos aspectos básicos referentes a histologia e função normal hepáticas, tais como seus mecanismos de regeneração e processos patológicos envolvidos no desenvolvimento de fibrose e cirrose hepáticas, seu diagnóstico e terapias atuais. Em seguida, são apresentadas as células-tronco mesenquimais, e sua obtenção através de membrana amniótica, assim como suas características e perspectivas acerca da terapia celular.

2.1 ANATOMIA, HISTOLOGIA E FISIOLOGIA HEPÁTICA

O **fígado** é o maior órgão do corpo humano, constituindo de 2 a 5 % do peso corpóreo. Sua divisão compreende dois lobos principais (direito e esquerdo), além de dois lobos acessórios (quadrado e caudado). Em ratos, a divisão dos lobos hepáticos compreende: lobo lateral esquerdo, lateral direito, médio, dois processos papilares e o processo caudado (BISMUTH, 1988; KOGURE et al., 1999; ALLER et al., 2012; CHEN et al., 2012b) (Figura 1).

Figura 1 - Anatomia do fígado de rato.

Fonte: (ALLER et al., 2012).

Legenda: ML = lobo médio. LLL = lobo lateral esquerdo. RLL = lobo lateral direito. CP = processos papilares. CL = lobo caudado.

É um órgão distinto, e muitas de suas várias **funções** estão inter-relacionadas. As funções básicas do fígado podem ser divididas em: funções vasculares para armazenamento e filtração do sangue; funções metabólicas relacionadas com a maioria dos sistemas metabólicos do organismo; e funções secretoras e excretoras, responsáveis pela formação da bile que flui dos ductos biliares para o trato gastrointestinal (GUYTON; HALL, 2002). O fígado auxilia em grande parte na manutenção da homeostase metabólica através do processamento de aminoácidos, carboidratos, lipídeos e vitaminas provenientes da alimentação; na metabolização de colesterol e toxinas; na produção de fatores de coagulação, e estoque de glicogênio (HEIDELBAUGH; BRUDERLY, 2006).

No rato, o fígado surge no 10º dia de gestação, estando já presentes as células de Kupffer. A delimitação anatômica ocorre no 12º dia, e a formação das células parenquimais prossegue até o 13º dia. Os ductos biliares são identificados entre o 17º e 18º dias. Durante este período, os hepatócitos são constituídos por uma população diplóide com atividade proliferativa transitória, além de conter células epiteliais progenitoras bipotenciais, que se diferenciam em hepatócitos e células epiteliais dos ductos biliares (HOUSSAINT, 1980; SHIOJIRI, 1984; MARCEAU et al., 1989).

A **composição histológica** do fígado é feita principalmente por células do parênquima (hepatócitos), além de outras células não parenquimais (células endoteliais, células de Kupffer, células estreladas hepáticas, células ovas), e pelo epitélio dos ductos biliares (GRISHAM, 1980; RAO, 2003).

Os **hepatócitos** são células poliédricas com 20 a 30 µm de diâmetro, apresentando um ou dois núcleos, e contando com grande diversidade de funções glandulares, atuando na síntese protéica, no acúmulo de metabólitos, na secreção da bile, e na desintoxicação e neutralização de substâncias (FELDMANN, 1989; MIZOBUCHI et al., 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). São responsáveis também pela produção de collagenases e estromelisina (ROEB et al., 1993), e pela produção de fatores necessários para a ativação da metaloproteinase-13 (MMP13) liberada pelas células estreladas (SCHAEFER et al., 2003). Essas células se agrupam em cordões que se anastomosam entre si, formando unidades funcionais denominadas **lóbulos hepáticos**. Os lóbulos têm formato poliédrico, e medem de 0,7 a 2 mm de tamanho, sendo separados por vasos sanguíneos e por uma faixa de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo é naturalmente visível em algumas espécies, como os suínos; porém, em humanos e ratos, os lóbulos estão diretamente em contato, sendo observada a deposição de colágeno somente em processos patológicos (ROUILLER, 1964; GUYTON;

HALL, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Já os vasos que se agrupam nos cantos do lóbulo hepático são chamados de espaço porta, ou tríades hepáticas, sendo compostos por um ramo da veia porta, da artéria hepática, e um ducto biliar, além de eventuais vasos linfáticos (RAO, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DUNCAN et al., 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Lóbulo hepático.

Fonte: (DUNCAN et al., 2011).

Legenda: A) Esquema representando tríade portal composta por ducto biliar, artéria hepática e veia porta. O sangue da artéria hepática e da veia porta irriga os hepatócitos pelos sinusóides. A bile produzida pelos hepatócitos é coletada pelos canalicúlos biliares e desemboca no ducto biliar. O canal de Hering é a junção entre a placa hepática e os ductos biliares, local onde residem as células ovais. B) Lóbulo hepático composto de uma veia central e seis tríades portais.

Outro conceito de divisão hepática, distinta dos lóbulos, é o **ácino hepático**. Este tem como centro o espaço porta, e divide o parênquima em três zonas: zona acinar I, ao redor do espaço porta; zona II, intermediária; e zona III, ao redor da veia centrolobular (RAPPAPORT et al., 1954).

O **suplemento sanguíneo** hepático ocorre principalmente pela veia portal e pela artéria hepática, sendo ambos os vasos aferentes que recebem nutrientes e toxinas a serem metabolizadas e transformadas para que possam ser excretadas pela urina e pela bile. Os vasos eferentes, pelos quais o sangue sai do órgão, são as veias hepáticas. (BERK et al., 1987; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A veia porta e a artérias hepática se ramificam dentro dos lóbulos, formando os capilares sinusóides, que recebem tanto sangue arterial quanto sangue venoso, realizando as trocas gasosas teciduais, e terminando na veia centrolobular. Entre os sinusóides, encontram-se os macrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer (GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004),

A parede dos sinusóides hepáticos é formada pelas **células endoteliais**, que apresentam também funções de transporte, coagulação, fibrinólise, inflamação, imunidade, angiogênese, metabolismo lipídico e síntese de componentes estromais (RIEDER et al., 1992).

Já as **células de Kupffer**, conhecidas também como macrófagos hepáticos, encontram-se entre os sinusóides, tendo forma estrelada e possuindo núcleo grande e oval. Apresentam intensa atividade fagocitária, atuando também na digestão da hemoglobina para produção de bilirrubina. São ricas em lisossomos, e endocitam 99 % dos microorganismos do sangue advindo da veia porta, além de liberar diversas proteases e citocinas quando ativadas (VA DEN OORD et al., 1991; MACPHEE; SCHIMIDT; GROOM, 1992; GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; DIXON et al., 2013). A ativação das células de Kupffer ocorre através de radicais livres, levando à produção de mediadores pró-inflamatórios (THOMPSON et al., 1998). Porém, estas células podem também produzir radicais livres de injúria tecidual através de lipoperoxidação, levando a modificações irreversíveis nas estruturas das membranas celulares e suas funções (BAUTISTA et al., 1990).

Na região perisinusoidal, no estreito espaço que separa a parede dos capilares, ocorre o espaço de Disse, onde estão localizadas as **células estreladas hepáticas**. Estas células são também conhecidas como células de armazenamento de gordura ou células de Ito, e tendo por função também o armazenamento de vitamina A (ARTHUR et al., 1998; GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; LEE et al., 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Originam-se de células da mesoderme, na qual há migração do septo transversal para o fígado no processo de diferenciação para células estreladas. Secretam ainda citocinas e fatores de crescimento que promovem a regeneração das células epiteliais hepáticas. Durante a fibrose, estas células são ativadas em miofibroblastos, perdendo seu estoque de vitamina A e levando a deposição da matriz extracelular característica da doença, com perda da arquitetura normal do órgão. (FRIEDMAN; WEI; BLANER, 1993; ZHANG et al., 1999; LEE et al., 2003; YIN et al., 2013). Já no processo de regressão da fibrose, estas células ativadas são reduzidas pela indução de senescência e apoptose, podendo retornar também ao seu estado quiescente (YIN et al., 2013).

Outro tipo celular encontrado no fígado são as **células ovais**, sendo conhecidas como as células-tronco hepáticas (PETERSEN; ZAJAC; MICHALOPOULOS, 1998). Medem aproximadamente 10 µm de diâmetro e núcleo bem oval (FARBER, 1956). São ativadas por

injúrias químicas aos hepatócitos nos processos de fibrose e cirrose, podendo se diferenciar em hepatócitos e colangiócitos (ALISON et al., 1996; PAKU et al., 2001).

Por fim, as **células epiteliais dos ductos biliares** representam 3-5 % da população hepática, tendo como função a modificação e composição da bile pela secreção de água, proteínas e bicarbonato, além de realizar a reabsorção de glicose, glutamato, ânions e proteínas (DESMET, 1991). A bile secretada pelos hepatócitos circula pelos canalículos biliares até a periferia do lóbulo, ingressando em pequenos ductos conhecidos como canais de Hering. Estes então desembocam em ductos maiores, chamados de ductos biliares perilobulares, que atravessam a lâmina terminal do espaço porta e desembocam nos ductos interlobulares perpendicularmente a estes espaços (HIB, 2003).

2.2 REGENERAÇÃO HEPÁTICA

Sabe-se que o fígado tem excepcional capacidade regenerativa após injúrias de caráter agudo decorrentes, por exemplo, de cirurgia ou de ação de toxinas (TARLÁ et al., 2006; MAO et al., 2014) e qualquer insulto crônico para o fígado pode dar origem à progressão para cirrose. Embora numerosos mecanismos fisiopatológicos de injúria ocorram, o trajeto final comum é persistente no envolvimento da cura, resultando na fibrose parenquimal hepática. Em muitas pessoas, aproximadamente 80-90% do parênquima hepático é destruído antes que a injúria hepática seja manifestada clinicamente. Quando as complicações da cirrose ocorrem, elas tipicamente estão relacionadas à função hepática debilitada ou à interrupção física e reorganização do parênquima hepático (FRIEDMAN; SCHIANO, 2004).

A **regeneração e a modulação tecidual** são controladas por diversos processos que incluem a migração celular; e a proliferação, degradação e síntese de matriz extracelular (FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995; HARUYAMA et al., 2000). A resposta hepática à injúria tecidual ocorre pela entrada de hepatócitos quiescentes no ciclo celular (TORRES et al., 1999), permitindo que o órgão regule seu próprio crescimento, e levando à restauração do volume e função normais (KATO et al., 2005; ARIAS et al., 1994).

Esta proliferação celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a regeneração compensatória e a hiperplasia direta (COLUMBANO et al., 1985). Na **regeneração compensatória**, a ressecção cirúrgica ou injúria hepática segue-se de proliferação de

hepatócitos e outros tipos celulares até atingir a massa tecidual original (LEMIRE; SHIOJIRI; FAUSTO, 1991; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997;). Na hepatectomia parcial, há preservação da trama de reticulina do fígado, permitindo proliferação proporcional de células parenquimais e não parenquimais, de modo que os hepatócitos se encaixem na matriz extracelular em uma arquitetura tecidual normal. (ARIAS et al., 1994). Em ratos, após hepatectomia parcial de 70 % do órgão, há restauração da massa original entre 7 e 14 dias pós-cirúrgicos (BUCHER et al., 2000).

No outro mecanismo, denominado **hiperplasia direta**, há estimulação do crescimento de hepatócitos por drogas, independente de injúria tecidual ou remoção cirúrgica, havendo aumento da massa hepática além da original. Após retirada do estímulo, a apoptose dos hepatócitos excedentes ocorre até restauração da massa normal do fígado (LEMIRE; SHIOJIRI; FAUSTO, 1991; COLUMBANO et al., 1985; FAUSTO, 2000).

Além dos hepatócitos, outros tipos celulares estão envolvidos no processo de regeneração hepática (MARCEAU et al., 1988). Após injúria química, as **células estreladas hepáticas** sofrem uma proliferação massiva (SELL; LEFFERT, 1982; YIN et al. 2013). Em outros casos, nos quais a proliferação de hepatócitos é inibida, as **células ovais** podem atuar se diferenciando em tecido hepático normal, tal como as células-tronco de origem hematopoiética, que se diferenciam tanto em hepatócitos quanto em colangiócitos (TARLÁ et al., 2006).

A proliferação hepática ocorre em tempos diferentes nas diversas regiões hepáticas, ocorrendo inicialmente nas áreas periportais (HARKNESS, 1952), ocorrendo então na zona intermediária, e por fim na zona central (RABES et al., 1976). O processo de regeneração pode ser dividido em três fases: iniciação, proliferação e inibição. Nestes processos, a sinalização entre o meio intracelular e a matriz extracelular promove uma resposta ordenada das células remanescentes (TARLÁ et al., 2006).

Na **iniciação**, diversas citocinas e fatores de crescimento levam a alterações da matriz extracelular, promovendo um processo proteolítico mediado por uma cascata complexa, e que leva a uma ativação ou inibição da proliferação celular. A atuação das citocinas promove uma resposta mitogênica que estimula a transição G0-G1, até a fase S, havendo a expressão de diversos genes que inibem o processo de apoptose celular. A sinalização central da transição G1-S é feita pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997; HAGA et al., 2003).

Na **proliferação**, a expressão do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) estimula a proliferação de hepatócitos e células endoteliais (AN et al., 1999). Por fim, na fase de **inibição**, a secreção do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) pelos hepatócitos e pelas plaquetas sinalizam a diminuição da síntese de DNA e o término do crescimento celular (NISHIKAWA; WANG; CARR, 1998).

A determinação da capacidade de proliferação celular pode ser realizada por imunohistoquímica, observando-se a expressão de **PCNA** (*proliferation cell nuclear antigen*). O PCNA é uma proteína nuclear associada com o ciclo celular, atuando como cofator para a DNA polimerase- λ . Sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo seu pico na fase S, e diminuindo a partir de G2, sendo indetectável na fase M e em células quiescentes (MORIS; MATHEWS, 1989).

2.3 FIBROSE E CIRROSE HEPÁTICAS

A **fibrose hepática** é um processo patológico decorrente de injúria hepática crônica, tendo como etiologia: toxicidade, estresse oxidativo, perodixação lipídica (CASINI et al., 1991; MIZOBUCHI et al., 1998), hipoxia (FAUSTO; MEAD, 1989), infecções e agentes metabólicos (FRIEDMAN, 2000). Caracteriza-se por uma resposta de cicatrização, havendo síntese e deposição de matriz extracelular em maior proporção que a regeneração de hepatócitos. Essa matriz é composta principalmente de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas não colagenosas (SCHUPPAN et al., 2001). Quando o excesso de colágeno é depositado no espaço de Disse, obstrui o fluxo de nutrientes da circulação sanguínea para o parênquima hepático, contribuindo para o agravamento da doença por hipóxia (FRIEDMAN, 1993).

Durante o processo de fibrose, há substituição do colágeno de tipo IV, de baixa densidade, por colágeno tipo I, de alta densidade (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006), acompanhado por ativação de macrófagos (células de Kupffer), proliferação e ativação de células estreladas (HSCs) e liberação de mediadores fibrogênicos (DEKEL et al., 2003; KANNO et al., 2003). Estas alterações têm por consequência ainda a distorção da arquitetura lobular e a redistribuição vascular, modificando gravemente a estrutura do fígado, e,

consequentemente, comprometendo sua função (BEDOSSA; PARADIS, 2003; BRUCK et al, 2007).

Em condições normais, a matriz extracelular compõe menos de 3 % do fígado, estando restrita as regiões perivasculares e as paredes dos sinusóides, e desempenha diversas funções, tais como: composição da arquitetura do órgão, promoção da proliferação e diferenciação celular e expressão gênica. É composta pelos colágenos dos tipos I, III, IV e V (BEDOSSA; PARADIS, 2003). Já na fibrose hepática, predominam os colágenos dos tipos I e III, que se depositam excessivamente no espaço de Disse e substituem o material constituinte da membrana basal, e ocasionam perda das fenestrações entre as células endoteliais, levando a uma redução do aporte sanguíneo e hipóxia tecidual (BEDOSSA; PARADIS, 2003; BRUCK et al, 2007, ZHENG et al., 2005).

O colágeno excessivo é sintetizado principalmente pelas células estreladas hepáticas (HSCs) quando ativadas, estimuladas por diversos fatores de fibrogênese (BATALLER; BRENNER, 2005; ZHENG et al., 2005). A ativação das HSCs leva a perda do depósito de vitamina A e a sua diferenciação em miofibroblastos, expressando a α -actina de músculo liso (α -SMA), que induz a produção de colágeno (LE COUTEUR et al., 2008).

Além do aumento da síntese do tecido conjuntivo, outro fator envolvido na fibrose hepática é a inibição da degradação da matriz extracelular (BENYON et al., 1996). Em condições normais, a quebra da matriz é promovida pelas metaloproteinases (MMPs). As células estreladas ativadas, no entanto, promovem a expressão dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), reduzindo a expressão das MMPs e favorecendo o acúmulo de colágeno (SCHAEFER et al., 2003; SCHUPPAN et al., 2003) (Figura 3).

Figura 3 – Esquema representativo da iniciação e manutenção da fibrogênese.

Fonte: (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

Observa-se também, na injúria hepática crônica, a proliferação de ductos biliares, que junto com a inflamação crônica pode agravar o processo de deposição de colágeno (MULLER et al., 1996).

A fibrose hepática, quando envolvendo processos de degradação da matriz extracelular e a retirada de sua causa, é potencialmente reversível (ZHENG et al., 2005). Em outros casos, porém, em que os processos de regeneração e reparo se tornam ineficazes, pode evoluir para um quadro irreversível denominado cirrose hepática, associado a alta morbidade e mortalidade (ALBANIS; FRIEDMAN, 2006; GNAINSKY et al, 2004).

A **cirrose hepática** nada mais é que uma enfermidade de caráter crônico e irreversível, caracterizada por apresentar modificações das unidades histológicas básicas do fígado; formando nódulos de regeneração e desarranjo dos hepatócitos, e acarretando difuso aumento no tecido conjuntivo, resultando em desorganização da arquitetura lobular e vascular (CONN; ATTERBURY, 1987; DESMET, ROSKAMS, 2004). Este processo de modificação das unidades histológicas é contínuo, gerando alterações estruturais que envolvem ondas de regeneração, perda de função e extensa substituição da arquitetura normal do fígado por tecido fibrótico (ROJKIND; PONCE-NOYOLA, 1982; ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1996).

A etiologia da cirrose hepática na medicina humana é abrangente, e pode envolver o consumo crônico de álcool, hepatite B e C, doença autoimune, histórico familiar, uso de

drogas intravenosas, histórico sexual e de transfusão de sangue (GARCÍA et al., 2002; FRIEDMAN; SCHIANNI, 2004). Na medicina veterinária, pode ainda estar associada a inflamações do trato gastrointestinal, uso prolongado de corticóides ou anticonvulsivos e infecções virais (FUENTEALBA et al., 1997).

Alterações na arquitetura vascular são os componentes cruciais no desenvolvimento do estado cirrótico, havendo aumento da resistência circulatória com consequente hipertensão portal, ativação de sistemas endógenos vasoativos, retenção de sódio e desenvolvimento de ascite (GROZSMANN; ATTERBURY, 1982). Podem ocorrer ainda anomalias como conexões arterio-venosas, desvios porto-sistêmicos e capilarização sinusoidal (KUMAR; SARIN, 2007). Este quadro leva à necrose hepática, na qual há perda da membrana celular dos hepatócitos e vazamento dos constituintes celulares, e, em casos terminais, à falência hepática, associada a severa disfunção do órgão, icterícia, encefalopatia hepática e coagulopatia (TREY; DAVIDSON, 1970).

Histologicamente, a cirrose é visualizada pela formação de septos fibrosos vascularizados que ligam os espaços porta entre si, e/ou com as veias centrolobulares. Estes septos circundam nódulos regenerativos de tecido hepático, conferindo um aspecto rígido ao órgão (SCHUPPAN, AFDHAL, 2008).

Atualmente, a cirrose hepática é considerada um processo irreversível (OE et al., 2003), sendo o único tratamento definitivo a longo prazo o transplante de fígado (FRIEDMAN, 2004; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). Dados recentes indicam índices de sobrevivência de 83 % em 1 ano, até 61 % em 8 anos após o transplante (ROBERTS et al., 2004).

2.4 BIOQUÍMICA HEPÁTICA

As provas bioquímicas hepáticas são indicadores diagnósticos do estado do fígado de um paciente. São divididos em três categorias de indicadores: **enzimas hepáticas, indicadores de síntese e metabolismo hepático e indicadores de transporte e excreção hepática** (GOMES et al., 2008).

As **enzimas hepáticas** estão relacionadas com a integridade dos hepatócitos, permitindo o desempenho normal do órgão em suas funções. As principais enzimas são a

aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico oxalacética (AST ou TGO), alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico pirúvica (ALT ou TGP), γ -glutamyl transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), e seus níveis séricos encontram-se aumentados na doença hepática. A **aspartato aminotransferase** (AST) cataboliza aminoácidos e permite que estes entrem no ciclo do ácido cítrico, ao promover a transaminação do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, formando oxalato. Apesar de estar relacionada com a integridade hepática, é pouco específica, e pode ser encontrada também no músculo cardíaco, rins, cérebro e hemácias (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A **alanina aminotransferase** (ALT/TGP) é utilizada nos processos de gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos, sendo responsável pela interconversão do grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, formando piruvato. É observada principalmente no fígado, mas também pode ser encontrada em músculos, coração, rins, cérebro e tecido adiposo, em quantidade muito pequena (SCHINDHELM et al., 2006). Ainda assim, é considerado um marcador específico de lesão hepática, e o aumento da sua concentração indica ruptura da membrana celular e, portanto, necrose tecidual. (MURIEL; ESCOBAR, 2003).

A fosfatase alcalina (FA) e a γ -glutamyl transferase (GGT) são enzimas indicativas de obstrução de ductos biliares, conhecida como colestase (KAPLOWITZ; EBERLE; YAMADA, 1982; GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005).

A **fosfatase alcalina** (FA) transporta metabólitos através das membranas celulares. É pouco específica para o tecido hepático, podendo ser observada nos ossos, intestinos, rins, placenta e leucócitos. No fígado, encontra-se no epitélio dos ductos biliares e na membrana dos hepatócitos. Níveis aumentados desta enzima podem estar correlacionados com a proliferação de ductos biliares (GIANNINI; TESTE; SAVARINO, 2005).

A **γ -glutamyl transferase** (GGT), por sua vez, é altamente sensível para a função hepática. Sua função é a catalisação da glutatona e seus conjugados, realizando a transferência do grupo γ -glutamyl entre aminoácidos. Está presente nos hepatócitos e no epitélio biliar, mas também em túbulos renais, pâncreas e intestino. É um indicador de colestase mais específico que a fosfatase alcalina, sendo seu aumento característico da doença hepática crônica (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

O segundo grupo são os **indicadores de síntese e metabolismo hepático**, compostos pelas proteínas hepáticas albumina (ALB) e globulina (GLOB). A **albumina** (ALB) tem participação no gradiente osmótico entre o sangue e o espaço extracelular, sendo responsável

por 70% da pressão osmótica sanguínea, além de captar e transportar algumas substâncias (BANKS, 1992). Na cirrose hepática, o comprometimento da função do órgão leva a redução dos níveis desta proteína (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A **globulina** (GLOB), juntamente com a albumina, compõe as proteínas totais plasmáticas (PT). Compreende três frações: α , β e γ , sendo as duas primeiras sintetizadas pelo fígado e responsáveis pelo transporte de substâncias, e a γ -globulina sendo sintetizada no sistema reticuloendotelial e compondo as imunoglobulinas (BANKS, 1992).

Na doença hepática, os valores das proteínas totais e da albumina encontram-se reduzidos, devido ao déficit de produção de albumina pelo fígado, ao aumento da permeabilidade capilar, expansão do espaço extracelular e extravazamento da albumina para o fluido extracelular. Os níveis de globulina, no entanto, podem estar aumentados (GERACI; MEDWAY, 1973).

O terceiro grupo, por fim, são os **indicadores de transporte e excreção hepáticas**, compostos pela bilirrubina total (TBIL) e proteína total (PT). A **bilirrubina** (TBIL) é formada a partir do metabolismo de eritrócitos. A hemoglobina perde sua porção heme e o ferro é liberado para os estoques teciduais, enquanto a globina é hidrolisada em aminoácidos. O grupo heme desprovido de ferro é denominado biliverdina, sendo este composto reduzido à bilirrubina pelo fígado. Esta bilirrubina é inicialmente insolúvel (não conjugada), tornando-se solúvel após ser conjugada pela glicuronil transferase. Esta forma solúvel é secretada pela bile, sendo excretada pelo rim na forma de urobilinogênio, enquanto uma pequena parte é reabsorvida pelo duodeno (BANKS, 1992; BANCROFT; GAMBLE, 2002). O aumento dos níveis de bilirrubina plasmática caracteriza a icterícia, provocando coloração amarelada da pele e dos olhos. Este aumento pode estar relacionado a destruição de eritrócitos, obstrução de ductos biliares ou lesão de hepatócitos (GUYTON; HALL, 2002). É considerada como um valor real de função hepática, visto que reflete a habilidade do fígado em recolher, processar e separar a bilirrubina da bile (BLANCKAERT; SCHMID, 1982).

As **proteínas totais** (PT) consistem na concentração plasmática de albumina e globulinas. Na cirrose hepática, o nível de proteínas encontra-se reduzido, interferindo no transporte de substâncias plasmáticas, e levando a diminuição da pressão osmótica vascular com formação de edema (GUYTON; HALL, 2002).

2.5 MATRIZ EXTRACELULAR E CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS

Além dos componentes celulares do fígado, a **matriz extracelular** (ECM) também exerce sua importância, fornecendo suporte às células, e ocupando menos de 3% do órgão em condições fisiológicas. É formada por colágeno dos tipos I, III e V, localizando-se na área portal e central (BEDOSSA; PARADIS, 2003), e sua rede contínua ao redor das células permite o estoque e transmissão de sinais intercelulares, além da liberação de fatores de crescimento, hormônios, enzimas e citocinas (RAO, 2003). No processo de cirrose hepática, a proporção total de colágeno pode passar de 2% para até 30% do total de proteínas do fígado (PINES et al., 1997; SPIRA et al., 2002).

As maiores responsáveis por este aumento da proporção de colágeno na cirrose hepática são as **células estreladas hepáticas** (HSCs). Quando quiescentes estas produzem baixos níveis de proteínas da matriz. Porém, quando ativadas por uma variedade de estímulos fibrogênicos, as HSCs se proliferam e transformam-se em miofibroblastos, expressando a α -actina de músculo liso (α -SMA) e induzindo a liberação massiva de colágeno tipo I (FRIEDMAN, 1993; GARCÍA et al., 2002; SCHAEFER et al., 2003; BIAN et al., 2014) e tipo III (BRENNER et al., 1993; SCHUPPAN et al., 1999; FRIEDMAN, 2000).

A ativação das HSCs ocorre em duas fases: iniciação (estágio pré-inflamatório) e perpetuação, podendo ser seguida de resolução caso a lesão seja revertida (FRIEDMAN, 2004).

Na **iniciação**, ocorre estimulação parácrina das células vizinhas às HSCs, tais como do endotélio sinusoidal, hepatócitos e plaquetas. Os hepatócitos, quando lesionados, sofrem peroxidação lipídica e se caracterizam como potentes fibrogênicos reativos ao oxigênio (NOVO et al., 2006). Ainda, a infiltração das células de Kupffer estimula a síntese de matriz, proliferação celular e liberação de citocinas pelas HSCs através da ação de citocinas e espécies reativas de oxigênio (BILZER; ROGEL; GERBES, 2006)

Em seguida, ocorre a **perpetuação**, na qual se manifestam as alterações celulares decorrentes da ativação das HSCs: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contractilidade, degradação da matriz e perda de retinóides. Estas mudanças decorrem no aumento do acúmulo de matriz extracelular, substituindo o tecido normal por tecido cicatricial (FRIEDMAN, 2008).

Na **proliferação**, diversos mitógenos favorecem a proliferação massiva das HSCs, sendo o mais importante o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (PINZANI, 2002), além do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (YOSHIJI et al., 2003); trombina (MARRA et al., 1998), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e fator de crescimento de queratinócitos (STEILING et al., 2004).

As HSCs são então direcionadas ao local da lesão através de **quimiotaxia**, sob a ação de quimioatrativos como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (IKEDA et al., 1999), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (MARRA et al., 1999) e receptor de quimiocina CXCR3 (BONACCHI et al., 2001). Ao alcançar a lesão, outros componentes, como a adenosina, atuam no enfraquecimento da quimiotaxia, imobilizando as HSCs no local (HASHIMI et al., 2007).

Na **fibrogênese**, as HSCs geram a fibrose em si, havendo um grande número de células produzindo uma grande quantidade de matriz extracelular, sobretudo colágeno do tipo I (INAGAKI et al., 2003). Diversos estímulos estão envolvidos neste processo, sobretudo o fator de crescimento transformante beta-1 (TGF β -1), que estimula não só a produção de colágeno, como também a de fibronectina e proteoglicanas (INAGAKI; OKAZAKI, 2007; GEORGE et al., 2000).

A **contractilidade** é determinante no aumento da resistência portal durante a cirrose hepática. As HSCs, convertidas em miofibroblastos, se agrupam em bandas e contraem os sinusóides, obstruindo o fluxo sanguíneo. Como contra-reguladores, atuam a endotelina-1 e o óxido nítrico (ROCKEY, 2003). Por fim, a ativação das HSCs é acompanhada pela **perda de retinóides** perinucleares característica (vitamina A) (FRIEDMAN; WEI; BLANER, 1993).

Duas citocinas são consideradas como as principais envolvidas na ativação das células estreladas hepáticas: o fator de crescimento transformante beta 1 (TGF β -1) e o fator de necrose tumoral alfa 1 (TNF α -1) (KNITTEL et al., 1999a).

Entre diversas funções do **TGF β -1**, estão a regulação da proliferação e migração de células musculares lisas vasculares, a inibição do crescimento e da diferenciação celular, promoção da apoptose, regulação da proliferação e diferenciação das células imunes, e a produção de proteínas da matriz extracelular (LETTERIO; ROBERTS, 1998; DENNLER; GOUMANS; TEN DIJKE, 2002). O TGF β -1 é inicialmente liberado na sua forma inativa em situações de injúria hepática crônica. A plasmina então libera a TGF β -1 da matriz extracelular para que ocorra sua ativação (ZHANG et al., 1999; YAMAGUCHI; MANN; RUOSLATHI, 1990) (Figura 4).

Figura 4 – Atuação do TGF β -1 no processo de ativação das células estreladas e desenvolvimento de fibrose.

Fonte: (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008).

A diminuição da degradação da matriz extracelular na injúria hepática crônica pode ser atribuída ao TGF β -1 por este ativar as HSCs (MARTI et al., 1993; BENTEN et al., 2005). A ativação das HSCs pela TGF β -1 leva a uma maior expressão de enzimas fibrogênicas como as TIMPs (ZHANG et al., 1999), PAI I (KNITTEL et al., 1999b) e de pró-colágenos α -1 (CASINI et al., 1993). Ainda, promove síntese e ativação da MMP2 (NAKAMURA et al., 2000), de citocinas inflamatórias (MARTELLI-JÚNIOR et al., 2003), e a estimulação das HSCs para sua entrada na fase S do ciclo celular (TSUKAMOTO, 1999).

O **TNF α -1** apresenta também grande importância no processo da ativação das HSCs (MARTI et al., 1993), sendo produzido por monócitos e macrófagos ativos (KANNO; TAZUMA; CHAYAMA, 2003). Porém, o TNF α -1 atua principalmente no aumento da expressão de MMPs na fase inicial da injúria hepática, estando envolvida na degradação inicial da matriz, que permitirá o reparo tecidual normal ou a progressão para a fibrose (SCHAEFER et al., 2003; KNITTEL et al., 1999a). Já o TGF β -1 atua em uma fase posterior,

expressando as enzimas fibrogênicas que caracterizarão a formação de tecido de granulação e cicatrização (FRIEDMAN, 1993; KNITTEL et al., 1999a).

2.6 GENES MODULADORES DA MATRIZ EXTRACELULAR

A modulação da matriz extracelular é realizada pela interação de diversos genes. Entre eles, estão as **metaloproteinases** (MMPs), também conhecidas como matrixinas. As MMPs são fatores chave na regulação das interações celulares e entre a matriz extracelular. Estão envolvidas na modificação da estrutura da matriz, na disponibilidade de fatores de crescimento e da função dos sistemas de sinalização de superfície celular, com consequente efeito na diferenciação celular, proliferação e apoptose; desempenham também um papel central na morfogênese, cicatrização, reparação e remodelação tecidual em resposta à injúria (LEE et al., 2003; MURPHY; NAGASE, 2008). No fígado, são produzidas principalmente pelas HSCs inativas (ROJKIND, 1982).

As MMPs podem ser divididas em quatro grupos: as collagenases (MMP 1, 8 e 13), que degradam colágenos fibrilares dos tipos I, II e III; as gelatinases (MMP 2 e 9), que clivam colágenos desnaturados, como o IV e o V; as estromelisinases (MMP 3, 10 e 11), que degradem proteoglicanas e glicoproteínas; e as outras MMPs, como as MMPs de membrana (MT-MMPs), MMP ácida (MMP 6) e MMP VII (KNITTEL et al., 1999b; MIZUTANI et al., 2001).

As **collagenases** (MMPs 1, 8 e 13) são as únicas capazes de degradar colágeno I, atuando portanto na resolução da fibrose hepática (SCHAEFER et al., 2003). São constituídas de um pró-peptídeo, domínios catalíticos e de hemopexina, podendo também degradar outras moléculas da matriz extracelular e proteínas solúveis. Porém, são incapazes de clivar colágenos fibrilares na ausência da hemopexina (CHUNG et al., 2004).

As **gelatinases** (MMPs 2 e 9) estão expressas em HSCs, miofibroblastos e nas células de Kupffer (KNITTEL et al., 1999b). Ambas as enzimas têm três repetições de uma fibronectina do tipo II modificada inserida no domínio catalítico; elas compartilham atividades proteolíticas semelhantes e degradam colágenos desnaturados, gelatinas e um número de moléculas da matriz extracelular, incluindo colágenos nativos tipos IV, V e XI, laminina e proteína nuclear. A MMP-2 digere colágenos nativos tipos I, II e III, porém de forma bem mais fraca que as collagenases (AIMES; QUIGLEY, 1995; PATTERSON et al.,

2001). A MMP2 é importante na regulação da membrana basal, degradando seus componentes como colágenos tipo IV, laminina e fibronectina. Sua expressão está aumentada na cirrose hepática, pois realizando a degradação da matriz perisinusoidal normal, leva à ativação das HSCs e consequente síntese de colágeno I (ALCOLADO; ARTHUR; IREDALE, 1997; ZHENG et al., 2005).

As **estromelisin** (MMPs 3, 10 e 11) possuem mesma organização que as collagenases, mas não clivam colágeno intersticial. MMP-3 e MMP-10 digerem diversos componentes da matriz extracelular, como proteoglicanas e glicoproteínas, porém a atividade da MMP-11 é muito fraca (MURPHY et al., 1993)

Por outro lado, as TIMPs (**tissue inhibitors of metalloproteinases** I-IV) são os inibidores das MMPs, que promovem o acúmulo de colágeno. São um grupo de quatro proteínas, que, conjuntamente, inibem efetivamente todas as MMPs (GOMEZ et al., 1997). Em conjunto, estes componentes atuam em diversos processos como o reparo tecidual ou a fibrose (LEE et al., 2003). São detectáveis em todos os tipos celulares hepáticos, apresentando níveis mais elevados em células não parenquimais de origem fibroblástica (HSC ativas e miofibroblastos) (KNITTEL et al., 1999a; ROJKIND, 1982). No processo de fibrose, a diminuição da degradação da matriz extracelular decorre da ação inibitória das TIMPs sobre as MMPs, sendo liberadas pelas HSCs sob indução do TGF β -1 (KNITTEL et al., 1999a).

Outro gene envolvido na modulação da matriz extracelular é a **uroquinase ativadora de plasminogênio** (uPA). Dois tipos de ativadores de plasminogênio podem ser distinguidos: o *tissue-type plasminogen activator* (tPA) e a *urokinase plasminogen activator* (uPA), diferindo quanto a sua reatividade e os genes que as codificam (VERHEIJEN et al., 1986). A uPA é uma molécula central na proteólise pericelular e na remodelação da matriz extracelular, enquanto a tPA parece estar associada à fibrinólise (CARRIERO et al., 2009). Enquanto tPA é ativo, a uPA é normalmente inativa no tecido normal, manifestando-se na injúria hepática (PETERSEN et al., 1998).

O plasminogênio está presente no plasma e no fluido extracelular, sendo ativado em plasmina pela uPA (MANGNALL et al., 2004). A plasmina, por sua vez, está envolvida em diversos processos relacionados à degradação da matriz extracelular, além de atuar na remodelação tecidual, inflamação, invasão tumoral, metástase e migração celular (ANDREASEN et al., 1997; DANO et al., 1985; VASSALLI; SAPPINO; BELIN, 1991; MANGNALL et al., 2004).

A uPA pode ser inibida pelos **inibidores dos ativadores do plasminogênio** (PAI-1 e 2). Ambos podem formar complexos estáveis, proteoliticamente inativos com uPA e tPA (QUAX et al., 1990). Desta forma, a uPA e o PAI são importantes reguladores do balanço entre as atividades proteolíticas e antiproteolíticas na modelação da matriz extracelular (ZHANG et al., 1999), e sua expressão está aumentada tanto em processos de regeneração hepática após hepatectomia, quanto na cirrose hepática (SEKI, 1996; ZHANG et al., 1999).

Estudos recentes indicam que o gene **Smad7** está intimamente relacionado à expressão das células-estreladas hepáticas, ao promover fosforilação de Smad2 e Smad3, que são mecanismos moleculares relacionados à fibrose hepática (BIAN et al., 2014).

2.7 PCNA

O **antígeno nuclear de proliferação celular** (PCNA) é uma proteína sintetizada durante a fase S do ciclo celular - na qual ocorre duplicação do material genético, tendo sido identificada em 1978 no núcleo de células em divisão (MIYACHI; FRITZLER; TAN, 1978; KELMAN, 1997). É um componente essencial na maquinaria de replicação do DNA, sendo utilizada na síntese do DNA cromossomal, além de estar associada a outros processos como o remodelamento da cromatina, reparo de DNA e no controle do ciclo celular (TAN et al., 1986; BRAVO et al., 1987; PRELICH et al., 1987; MAGA; HUBSCHER, 2003).

O PCNA é um dos marcadores de proliferação celular mais utilizado na imunohistoquímica, podendo aparecer em diversas fases do ciclo celular, mas sendo altamente expressa durante a fase S do ciclo celular (MAGA; HUBSCHER, 2003). Está presente no processo de regeneração hepática e hepatocarcinogênese (MEHTA, 1995; KANG et al., 2013), apesar de estarem pouco presentes na ocorrência de nódulos hepáticos benignos (LAI et al., 2014). Além disso, tem sido demonstrada positividade para o PCNA em ratos submetidos à cirrose hepática pelos modelos do tetracloreto de carbono (CCl₄) e da tioacetamida (TAA) (WANG et al., 1999; CHAN et al., 2010; GU et al., 2011).

Normalmente, o PCNA está ausente ou minimamente expresso no fígado normal, apesar de seu alto *turnover* celular (MUN et al., 2006). Porém, três tipos de PCNA parecem coexistir: tipos H, P e L, sendo que os dois últimos estão expressos no citoplasma e não no

núcleo, e podem estar expressos em quantidade significativas no tecido íntegro (TANNO and TAGUCHI, 1999).

2.8 MODELOS DE CIRROSE HEPÁTICA

Diversas modelos experimentais podem ser utilizados para reproduzir injúria hepática, tanto por métodos físicos quanto químicos, destacando-se a ligadura do ducto biliar, e o uso de substâncias: tetracloreto de carbono (CCl_4), dimetilnitrosamina (DMN) e tioacetamida (TAA). A **ligadura do ducto biliar** produz um quadro de cirrose em cerca de 28 dias, caracterizando portanto uma lesão aguda (MILTERSTAINER et al., 2003). Após um período de 15 dias da desobstrução, as alterações metabólicas e bioquímicas não são completamente reestabelecidas (KONTOURAS et al., 1984). A ligadura do ducto de um único lóbulo também produz lesão hepática em outras regiões do fígado por meios parácrinos e endócrinos (TANNURI et al., 2012).

A **dimetilnitrosamina** (DMN) é um composto hepatotóxico, mutagênico e carcinogênico, podendo ser absorvido por ingestão ou inalação, e levando a irritações oculares, na pele, no trato respiratório, e em períodos prolongados provoca lesão hepática e aparecimento de tumores (KHANNA; PURI, 1966). Causa grande taxa de mortalidade quando usado em altas doses; em baixas doses, não induz à cirrose de modo eficaz. Apesar de ter sido um modelo clássico para indução de cirrose em ratos, sua alta mortalidade, necrose e inflamação refletem um quadro pouco comparável à cirrose observada nas clínicas (SCHUPPAN; STROBEL; HAN, 1998; WATSON, 2004).

O uso do **tetracloreto de carbono** (CCl_4) também é efetivo na indução da cirrose hepática, causando aumento significativo das transaminases (AST, AST) e fosfatase alcalina (FA), além de diminuição da proteína total, albumina e hematócrito (DIAZ-GIL et al., 1999). Verifica-se a presença histológica de nódulos de regeneração e infiltrados inflamatórios (KANNO et al., 2003), esteatose, necrose, fibrose, proliferação de ductos biliares e regeneração nodular (TREY; DAVIDSON, 1970).

A hepatotoxicidade do CCl_4 está relacionada com a liberação de radicais livres que induzem à peroxidação lipídica e lesão de membrana de hepatócitos (SUN et al., 2001). A administração deste composto durante 8 semanas em ratos produz fibrose hepática (LI et al.,

2003), enquanto seu uso por 14 semanas promove cirrose hepática (DIAZ-GIL et al., 1999; SIMILE et al., 2001).

A **tioacetamida** (TAA) é utilizada normalmente nas indústrias de couro, papel e têxtil, como um acelerador na vulcanização da borracha e estabilizador de combustíveis (WANG et al., 2000). É um agente hepatotóxico bem conhecido em vários modelos animais após prolongada administração (MOREIRA et al., 1995; DAVID et al., 2002), e requer ativação metabólica para apresentação deste efeito. Após sua metabolização, produz S-óxido de tioacetamida e S-dióxido de tioacetamida, sendo este último altamente reativo, e se ligando às macromoléculas teciduais (CHILAKAPATI et al., 2005; HAJOVSKY et al., 2012).

A ativação da TAA é realizada pela ação do complexo citocromo P-450, assim como a do CCl₄ (WANG et al., 2000). Reduz a atividade antioxidante, promove peroxidação lipídica com a destruição das membranas celulares, altera o ciclo da uréia, e estabelece um estresse oxidativo que leva à necrose tecidual (DAVID et al., 2002; TÚNEZ et al., 2005). Os radicais livres gerados por esta via oxidativa provocam aumentos no cálcio citosólico, inibição da glutatona e redução dos grupos tiol (-SH), afetando severamente as células da região acinar pericentral e levando à morte celular. (SANZ et al., 1998; ZARAGOZA et al., 2000). A toxicidade da TAA leva à destruição do parênquima com rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática (MUÑOZ TORRES et al., 1991).

Suas vantagens relação ao CCl₄ estão na sua baixa mortalidade, sendo de apenas 35 % em relação aos 50 % do CCl₄; além da segurança e praticidade da indução (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), ainda que o tempo para indução seja maior (SEONG et al., 2003). Causa lesão caracterizada por necrose celular, fibrose, reorganização micronodular do parênquima, proliferação de ductos, aumento das transaminases, peroxidação das membranas lipídicas, aumento da fosfatase alcalina e cirrose macronodular, com formação de nódulos regenerativos e necrose centrotubular semelhantes ao da cirrose humana (TREY; DAVIDSON, 1970; MULLER et al., 1996; SUN et al., 2000; HATAKEYAMA et al., 2002; LALEMAN et al., 2006). Promove uma lenta deposição de colágeno, estabelecendo cirrose após a 10ª semana de tratamento (SPIRA et al., 2002). Essa lenta deposição reproduz o caráter crônico da cirrose humana, sendo adequada como um modelo experimental (MASUMI et al., 1999)

A TAA pode ser administrada por diferentes vias: oral, por intubação intragástrica, ou por injeções subcutâneas ou intraperitoneais (FONTANA et al., 1996). A administração de TAA através da por via oral consiste em um método não invasivo, mas à medida que ocorre o

comprometimento do fígado do animal, ele apresenta perda de apetite e redução na ingestão da água com o fármaco, diminuindo a sua eficiência. (GEORGE et al., 2001; LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Desta forma, a via mais usual é a via intraperitoneal, havendo produção de fibrose após 7 semanas de indução; e cirrose após 10 semanas (HATAKEYAMA et al., 2002; DEKEL et al., 2003; IIMURO et al., 2003; GNAINSKY et al., 2004).

Após um determinado período de administração da TAA, o animal adquire certo grau de resistência à droga, levando a uma variação na sensibilidade hepática (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002). Dois fatores contribuem para esta variação de resposta: o envelhecimento do animal e a redução do citocromo P-450, devida ao dano celular. As diferenças na atividade do sistema enzimático são dependentes da idade, apresentando aumento dos 2 aos 12 meses, nos ratos, e diminuindo na senescência (ZARAGOZA et al., 2000). Assim, sugere-se que as doses sejam ajustadas de acordo com as oscilações de peso dos animais. Esse método resultaria em aumento no rendimento da indução do quadro cirrótico e redução expressiva da mortalidade (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002).

2.9 TERAPIA CONVENCIONAL DA CIRROSE HEPÁTICA

Em grande parte, os tratamentos de fibrose e cirrose hepática focam somente na supressão do agente desencadeador da lesão (GARCIA et al., 2002), ou na melhora de algumas manifestações da doença, tal como a hipertensão portal e a ascite (EPSTEIN, 1988). Entretanto, o tratamento efetivo tem como alvo a redução da síntese e a degradação da matriz extracelular (WILLIAMS et al., 2001), sendo as HSCs o foco mais importante, visto que a sua inibição levaria a diminuição da deposição de colágeno no fígado (DEKEL et al., 2003).

Entre as tentativas para remissão da cirrose hepática está a **hepatectomia parcial** (HASHIMOTO et al., 1998; BARATTA et al., 1996; FAUSTO et al., 1995). Seu uso parte do princípio de que um fígado normal, após hepatectomia de 70-90 %, pode alcançar seu volume original em um período de 10-14 dias em ratos, e 21 dias em humanos (BUCHER, 2000). Em ratos fibróticos hepatectomizados, verificou-se que a regeneração leva a uma massa parenquimal com menos colágeno e mais próxima do normal. No entanto, fígados cirróticos tendem a se regenerar com cirrose (PARRA et al., 1995a). Além disso, os riscos cirúrgicos

deste procedimento em um paciente com insuficiência hepática representam um grande risco de complicações no trans e no pós-operatório (NOGUCHI et al., 1990; ANDIRAN et al., 2000).

Uma grande variedade de **medicamentos** tem sido utilizada para promover uma cura ou remissão parcial da fibrose e cirrose. A silimarina, uma das mais utilizadas por seu efeito antioxidante e quimioprotetor, promoveu melhora hepática no modelo da tioacetamida, com redução da expressão das TIMPs e de TGF β -1 (CHEN, I. et al., 2012). O pirfenidone inibiu também o TGF β -1, assim como a proliferação de fibroblastos (DI SARIO et al., 2004). A relaxina, fator de crescimento semelhante à insulina, é um conhecido hormônio reprodutivo, e em modelos de fibrose tem demonstrado redução da expressão do colágeno I e da TIMP 1 (WILLIAMS et al., 2001). O uso de tugsten inibe a progressão de radicais livres, e está associado a um decréscimo de ALT, AST e FA, e redução da mortalidade dos animais (PAWA; ALI, 2004). Pirfenidone também reduz os níveis de ALT, AST e FA, e possibilidade um rearranjo do parênquima hepático, diminuindo a expressão de colágeno 1, 3, 4, TGF β -1, TIMP I e PAI I, reduzindo em 40 % a fibrose causada por CCl₄.(GARCIA et al., 2002).

Outras drogas apresentaram também pequenas reduções da expressão gênica relacionada à síntese de colágeno e dos níveis séricos dos indicadores de lesão hepática, porém em menores proporções, tais como o α -tocoferol (ANDIRAN et al., 2000); o losartan (TERUI et al., 2002), o gliotoxin (KARIN; BEM-NERIAH, 2000), o halofuginone (GNAINSKY et al., 2004), entre outros.

A **terapia gênica** também já foi testada para o tratamento da cirrose. Um vetor adeno viral conduzindo um cDNA modificado de uPA foi injetado por via intravenosa, tendo havido um aumento da expressão de collagenases, reversão parcial da fibrose e melhora das funções hepáticas (SALGADO et al., 2006). O uso de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) também diminuiu a fibrose e induziu regeneração hepática (OE et al., 2003). Tratamento com MMP I humano em ratos cirróticos por adenovírus recombinante reduziu níveis de ALT, aumentou a proliferação hepatocitária e atenuou a fibrose. Sua exposição prolongada, porém, pode ter efeitos carcinogênicos (IIMURO et al., 2003).

Os **fatores hepatotróficos** também têm sido bastante estudados, considerando-se que a condição do fígado é também influenciada pelo estado nutricional. Em ratos desnutridos, o fígado se regenera bem mais lentamente após hepatectomia parcial (DOYLE et al., 1968). Parra et al. (1992) testou uma solução de fatores hepatotróficos com aminoácidos, vitaminas e sais minerais, observando aumento de 34,48 % da massa hepática. A adição de insulina,

glucagon e triiodotironina pode elevar este aumento para 67 % (PARRA et al., 1995b). Em fibrose induzida pela dimetilnitrosamina, houve acentuada redução do colágeno periportal e intersticial com melhor dos parâmetros bioquímicos, após dez dias de tratamentos com fatores hepatotróficos (PEREIRA et al., 2003). Em animais submetidos à cirrose pela tioacetamida, também houve aumento de massa hepática, redução volumétrica do colágeno, melhora dos parâmetros bioquímicos, e redução da expressão de colágeno, MMP2, TIMP-1 e TGF β -1 (GUERRA et al., 2009).

Outras terapias que foram utilizadas com sucesso limitado para o tratamento da cirrose hepática foram: enzima conversora de angiotensina pelo lisinopril (RAMALHO et al., 2001); oxigenação hiperbárica (OZDOGAN et al., 2005); transplantação hepática (NOGUCHI et al., 1990; BISMUTH; CHICHE; CASTAING, 1995; NZEAKO, GOODMAN, ISHAK, 1996; HEIDELBAUGH; BRUDERLY, 2006); proteína ALR, aumentadora da regeneração hepática (DAYOUB et al., 1994); aplicação de bradicinina em animais com cirrose crônica, por meio da análise dos componentes do sistema caliceína-cinina (SANCHO-BRU et al., 2007);

2.10 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco são definidas como células capazes de auto-renovação e de gerar células diferenciadas de um determinado tecido (KOOY et al., 2000,).

De acordo com o potencial de diferenciação das células-tronco, essas as células podem ser classificadas em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes. As totipotentes são as células capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário ou de anexos embrionários, isso é, gerar qualquer tipo celular; as pluripotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, isso é, são progenitoras de tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma); as multipotentes podem diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão e com isso, possuem plasticidade limitada e as oligopotentes ou unipotentes podem originar poucos tipos celulares ou apenas um (ZHANG et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (MSC) foram isoladas inicialmente em 1976, por Friedstein et al, como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia

semelhantes a fibroblasto *in vitro*. Em 1991, Caplan definiu o termo MSC como sendo uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes à da sua origem. Em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu que: as MSC devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e, devem se diferenciar em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

2.11 CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Recentemente, novas fontes de células-tronco mesenquimais tem se mostrado eficientes, tais como aquelas derivadas de membranas fetais. Em especial, as células derivadas de membrana amniótica são fontes valiosas de células-tronco, sendo facilmente obtidas não-invasivamente da membrana amniótica da placenta ao término da gestação (ZHAO et al., 2005; MANUELPIILLAI et al., 2011; VERYASOV et al., 2014). Ainda, não induzem a formação de tumores ou infecções virais, e proporcionam um alto rendimento em cultura (SANT'ANNA et al., 2011; VERYASOV et al., 2014). Uma cultura tipicamente rende entre $150-200 \times 10^6$ células-tronco de epitélio amniótico e $20-50 \times 10^6$ células-tronco mesenquimais amnióticas (TODA et al., 2007).

A membrana amniótica representa a mais interna das duas membranas fetais que circundam o feto durante gestação. Essa membrana fina e avascular permeia a cavidade amniótica e é banhada pelo fluido amniótico. É composta pelo epitélio amniótico, que é composto de uma camada única de células cubóides e colunares, e a mesoderme amniótica, com uma rede de células mesenquimais e alguns macrófagos dispersos. (PAROLINI et al., 2009; MIKI; GRUBBS, 2014) (Figura 5).

Embriologicamente, as duas camadas da membrana amniótica se originam antes da gastrulação. Em humanos, ela surge, entre o oitavo e nono dias após a fertilização, quando a implantação do blastocisto já ocorreu, havendo a diferenciação da massa interna celular se diferencia em epiblasto e hipoblasto, os quais formam o disco embrionário bilaminar. Do epiblasto, algumas células que depois formarão o epitélio amniótico surgem entre a parede do

blastocisto e o disco embrionário, e envolvem um espaço que se tornará a cavidade amniótica (PAROLINI et al., 2009).

A membrana amniótica humana contém duas populações celulares distintas. Células epiteliais de membrana amniótica humana (hAEC) são células cubóides a colunares que formam uma monocamada delineando a membrana, em contato direto com o fluido amniótico. Advém do epiblasto embrionário e estão entre as primeiras células a se diferenciarem no conceito. Em contraste, as células mesenquimais estromais da membrana amniótica humana (hAMSC) estão dispersas em uma matriz extra-celular composta de colágeno e laminina, e são derivadas da mesoderme extraembrionária. Ambos os tipos celulares originam-se durante os estágios de pré-gastrulação da embriogênese antes do delineamento das três camadas germinativas primárias (PAROLINI et al., 2008; MIKI; GRUBBS, 2014).

Figura 5 – Origem das células-tronco de membrana amniótica.

Fonte: (MIKI; GRUBBS, 2014).

Legenda: Embrião em estágio inicial (esquerda), e placenta a termo corada por hematoxilina-eosina (direita), diferenciando células amnióticas epiteliais (verde) e mesenquimais (vermelho).

Devido a esse surgimento das membranas fetais em um estágio inicial do desenvolvimento embrionário, as células-tronco mesenquimais de membrana amniótica têm a capacidade de se diferenciar em células de linhagem não só mesodérmica, mas também ectodérmica e endodérmica. (PORTMANN et al., 2006; TAMAGAWA et al., 2007).

Protocolos eficientes já foram estabelecidos para isolamento de hAEC e hAMSC de placenta e são geralmente baseados na separação mecânica da membrana amniótica da

membrana coriônica (SONCINI et al., 2007) e subsequente digestão enzimática com tripsina ou dispase para liberação de células epiteliais; ou collagenase para liberação das mesenquimais (PAROLINI et al., 2008).

Marcus et al. (2008) conduziu um estudo acerca de protocolos de isolamento, caracterização e potencial de diferenciação das células-tronco de membrana amniótica de ratos *in vitro*. Neste estudo, células derivadas do âmnion isoladas de explantes de membrana amniótica murina expressaram os marcadores de superfície CD29 e CD90, mas foram negativas para marcadores linfohematopoiéticos CD45 e CD11b. Ainda, análise de expressão gênica revelou expressão de fatores transcricionais envolvidos na manutenção da pluripotência, como Nanog e SOX-2, assim como genes característicos das três camadas germinativas, como proteínas estruturais da neuroectoderme (MAP-2 e NF-M), genes mesodermiais expressos em ossos (fosfatase alcalina, osterix), gordura (adipsina) e células musculares (SM22- α), e genes endodermiais do pulmão e do fígado (α_1 AT). Foi obtida diferenciação *in vitro* para as três camadas germinativas, demonstradas por colorações histológicas específicas.

Foi reportado que membrana amniótica libera potentes citocinas imunomoduladoras e anti-inflamatórias (IL-10, IL-6), fatores de crescimento associados com cicatrização de feridas, tais como fatores angiogênicos (VEGF, PDGF), e fatores de proliferação (fatores de crescimento epidermal, de hepatócitos e de fibroblastos) (PARADOWSKA; BLACH-OLSZEWSKA; GEJDEL, 1997; STEED et al., 2008; PAROLINI et al., 2010).

Outra característica notável em estudos pré-clínicos envolvendo membrana amniótica é a ausência de rejeição dos hospedeiros após xenotransplante em animais imunocompetentes sem tratamento prévio com imunossupressores. As hAMSCs expressam baixos níveis de HLA classe IA e ausência de HLA-DR, moléculas CD40, CD80 e CD86, que estimulam receptores de células T ou são apresentados indiretamente através de células apresentadoras de antígeno. Investigação de possíveis mecanismos envolvendo as hAMSC mostraram que elas são capazes de sequestrar monócitos na fase G0 do ciclo celular, abolir TNF- α e citocinas CXCL10, CXCL9 e CCL5 enquanto eleva a secreção de citocinas CCL2, CXCL8 e IL-6 relacionadas a Th2 (BILIC et al., 2008; PAROLINI et al., 2008).

2.12 TERAPIA CELULAR

Hepatócitos adultos e várias populações de células progenitoras hepáticas e células-tronco tem sido estudadas por sua capacidade regenerativa. O transplante de hepatócitos para tratamento de deficiências metabólicas tem mostrado melhora na função hepática; porém, sucesso a longo-prazo ainda não foi alcançado. (FLOHR et al., 2009).

Recentemente, utilizou-se implantação de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, para tratamento de falência hepática, em um modelo de cirrose hepática induzido por tioacetamida em ratos, após 8 semanas de indução, obtendo-se diferenciação dessas células em células ovas progenitoras e hepatócitos, resultando em efeitos terapêuticos variados, tais como reparo de hepatócitos danificados, restauração do glicogênio intracelular e resolução da fibrose (HWANG et al., 2011). Entretanto, já foi demonstrado anteriormente que a mobilização de células-tronco hematopoiéticas para a circulação periférica parece ser uma resposta fisiológica a injúria hepática, porém com baixa eficácia. Há um aumento nas células CD34 no sangue periférico de pacientes com injúrias agudas tais como intoxicação por paracetamol ou hepatite alcoólica, mas não em pacientes com doença hepática crônica (DALAKAS et al., 2004).

Em outro estudo no qual células foram infundidas após um protocolo de indução da cirrose crônica, aparentemente houve transdiferenciação das células-tronco de medula óssea infundidas, para um fenótipo de célula hepática madura. Ainda neste estudo, o nível plasmático de albumina subiu de 1,62 g/dL em animais acometidos, para 2,08 g/dL nos animais submetidos a terapia celular, sendo 2,5 g/dL para o grupo controle, associando-se com a expressão da albumina em 42% dos hepatócitos (CHIOZZI et al., 1997).

Em 2007, Muraca e colaboradores infundiram pela veia porta células-tronco derivadas de medula óssea de ratos, em ratos Gunn (que são deficientes em bilirrubina glicuronil-transferase) e observou uma proliferação de células hepáticas e redução do nível plasmático de bilirrubina indireta em 35 % (MURACA et al., 2007).

Uma variedade de vias de administração tem sido utilizadas, com alguns usando infusão direta na veia porta ou artéria hepática (GORDON et al., 2006; KHAN et al., 2008; MOHAMADNEJAD et al., 2007; PAI et al., 2008), e outros, utilizando infusão periférica de células-tronco (TERAI et al., 2006). Um estudo animal sugeriu que a rota pode não ser importante (ZHANG et al., 2009). Aumento da proliferação de hepatócitos e de células

endoteliais tem sido mostradas na biópsia (YANNAKI et al., 2006), assim como melhoras na bilirrubina e albumina (GORDON et al., 2006; PAI et al., 2008; TERAJ et al., 2006).

Diversos usos terapêuticos também têm sido atribuídos a membrana amniótica e aos seus diferentes tipos celulares. Atualmente, a membrana amniótica é utilizada para o tratamento de queimaduras dermais, úlceras indolentes e feridas traumáticas (SINGH et al., 2004). É utilizada também como enxerto para reparo de defeitos de córnea, conjuntiva e bulbo, além da aplicação em incisões cirúrgicas realizadas em cirúrgicas oftálmicas corretivas (KRUSE and CURSIEFEN, 2008).

Estudos pré-clínicos demonstram que o uso de células-tronco de membrana amniótica pode ser benéfico para o reparo e a progressão de lesão em tecidos moles. O enxerto de células-tronco derivadas de membrana amniótica humana em um coração isquêmico de ratos melhoram a função cardíaca (CARGNONI et al., 2009a; 2009b). Neste tipo de estudo, as células amnióticas contribuíram significativamente na reposição de epitélio alveolar danificado, endotélio e músculo cardíaco (MOODLEY et al., 2010; TSUJI et al., 2010).

O uso das células-tronco derivadas de membrana amniótica pode ser também uma alternativa promissora para o tratamento e o retardo da progressão da fibrose e cirrose hepáticas. Já foi comprovado que estas células são capazes de se implantarem no fígado e de se diferenciar na linhagem hepatogênica *in vitro* (BAILO et al., 2004; MIKI; STROM, 2006; TAKASHIMA et al., 2004; TAMAGAWA et al., 2007).

Sant'Anna et al. (2011) aplicou membrana amniótica na superfície hepática de ratos após indução de fibrose pela técnica de ligação de ducto biliar, observando redução na severidade da fibrose, limitando-se a região periportal, sem estabilização de cirrose após 6 semanas, e 50 % menos deposição de colágeno.

Outros estudos foram realizados para investigar o efeito das células de membrana amniótica em modelos experimentais de cirrose hepática induzidos por tetracloreto de carbono, demonstrando que as células se infiltraram e persistiram por várias semanas no fígado após injeção intravenosa, sendo observada redução de IL-6, TNF- α e colágeno no parênquima hepático. Ainda, o número de hepatócitos em processo de apoptose e a quantidade de células estreladas hepáticas ativadas para deposição de colágeno apresentaram redução significativa (MANUELPIILLAI et al., 2010).

Zhang et al. (2011) induziu cirrose através da aplicação de tetracloreto de carbono durante 8 semanas em camundongos imunocompetentes C57BI/6J. Células-tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica humana foram infundidas no baço após 4

semanas, e reduziram significativamente a formação de fibrose e a formação de cirrose induzida por tetracloreto de carbono em camundongos, através da supressão da ativação de células-tronco estreladas, redução da apoptose e promoção da regeneração hepática, assim como redução da senescência. Imunofluorescência e PCR revelaram que os enxertos nos fígados dos hospedeiros expressaram marcadores específicos para hepatócitos, como albumina e α -fetoproteína.

Pelo menos dois mecanismos foram propostos para a potencial função terapêutica das células-tronco mesenquimais na fibrose hepática: uma implica na habilidade dessas células se infiltrarem no fígado e diferenciarem na linhagem hepatogênica, portanto participando na regeneração do parênquima endógeno; o outro possível mecanismo, que parece mais provável, está relacionado a habilidade das células-tronco mesenquimais de produzirem e ativarem mediadores parácrinos, como IL-10, TNF- α e HGF, que levam a redução da fibrose (HENDERSON;FORBES, 2008).

Investigações ainda mostraram que o ácido hialurônico presente na matriz de membrana amniótica pode suprimir TGF- β e inibir a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, além de ser uma citocina pró-fibrogênica, e sua redução pode portanto inibir a síntese de colágeno. (TSENG et al., 1999). A redução dessa proteína apresentou indução de metaloproteinases que degradam o colágeno e uma redução de suas inibidoras, as proteínas TIMP (MANUELPILLAI et al., 2010).

Em um estudo mais recente, Hodge et al. (2014) demonstrou que o meio condicionado contendo somente os fatores liberados pelas células-tronco derivadas de epitélio de membrana amniótica foi capaz de produzir melhora do quadro de fibrose, como demonstrado por redução em níveis de TGF β -1 e α -SMA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE RATAS

Para a cultura de células-tronco de membrana amniótica, foi utilizada uma rata *Wistar* prenhe. Após eutanásia seguindo as recomendações do CEP, a membrana amniótica foi isolada dos outros anexos fetais, e o tecido foi então lavado três vezes com PBS contendo 5 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina/anfotericina B - Sigma Aldrich, MO, EUA). Após lavagem, a membrana foi fragmentada com auxílio de um bisturi e, após obtenção de um homogeneizado, os fragmentos foram transferidos para placas de cultivo de 30 x 15 mm de diâmetro contendo meio DMEM-High glucose (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) acrescido de 20 % de soro fetal bovino (Invitrogen, CA, EUA) e 1 % de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Sigma Aldrich). Após alguns dias houve liberação de células do explante, e a cultura primária foi replicada, e algumas amostras congeladas para uso posterior.

Para o congelamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm, sendo o precipitado ressuspensionado em solução de congelamento contendo 90 % de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO - LGC Biotecnologia). Em seguida, os tubos foram alocados em freezer - 80°C, e, no momento do uso, descongeladas rapidamente em banho-maria e colocadas em cultivo.

Para facilitar o rastreamento destas células após o transplante, as mesmas foram transduzidas com retrovírus recombinante carregando o gene repórter, *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), gentilmente doados pela Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

3.2 ANIMAIS

Trinta (30) ratas (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com aproximadamente 2 meses de idade e 200 gramas de peso corpóreo foram utilizadas. Estes animais foram alojados no biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT - FMVZ/USP).

Durante o período experimental, os animais foram alojados em caixas de polipropileno (3 animais por caixa), providas de bebedouro e comedouro; mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22-24°C) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro); sendo fornecida ração comercial e água *ad libitum*. Os animais dos respectivos grupos foram submetidos a pesagem semanal.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolado sob o nº 2599/2012.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E INDUÇÃO DA CIRROSE HEPÁTICA

Os animais foram identificados e ordenados em sete grupos:

- **Cir⁸** (n = 6): animais submetidos a 8 semanas de indução (fibrose), sem tratamento.
- **Cir^{8t}** (n = 6): animais submetidos a 8 semanas de indução (fibrose), com tratamento.
- **Cir¹⁴** (n = 5): animais submetidos a 14 semanas de indução (cirrose), sem tratamento.
- **Cir^{14t}** (n = 5): animais submetidos a 14 semanas de indução (cirrose), com tratamento.
- **Ct⁸** (n = 3): animais submetidos a 8 semanas de aplicação de solução fisiológica (controle manejo).
- **Ct¹⁴** (n = 3): animais submetidos a 14 semanas de aplicação de solução fisiológica (controle manejo).
- **Cir⁰** (n = 2): grupo controle.

Além dos animais utilizados para o tratamento, um animal foi utilizado para retirada de membrana amniótica.

A metodologia de indução da cirrose pela administração da tioacetamida (TAA – Sigma-Aldrich) seguiu o protocolo determinado por Oe et al. (2003). Os animais foram induzidos à fibrose e cirrose hepática, através da administração de TAA a 4% (200mg/Kg de peso corpóreo), diluída em solução fisiológica 0,9% (Samtec Biotecnologia, Ribeirão Preto, Brasil), aplicada intraperitonealmente 3 vezes por semana, durante 8 semanas para os grupos **Cir⁸** e **Cir^{8t}**, para indução de um estágio de fibrose do órgão; e 14 semanas para os grupos **Cir¹⁴** e **Cir^{14t}**, para obtenção de estágio mais avançado de cirrose hepática. Além disso, a cada 24 dias, após o início da administração, houve acréscimo de 10% da solução de TAA até completar as 8 ou 14 semanas pretendidas, para evitar adaptação dos animais a droga (Figura 6).

Figura 6 - Desenho experimental.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: A figura indica as coletas de sangue mensais e aumentos de dose a cada 21 dias durante a indução da fibrose/cirrose.

3.4 TERAPIA CELULAR

3.4.1 Animais

Seguido o término da indução foi realizada eutanásia de 2 animais por grupo e, então, os grupos **Cir**⁸ e **Cir**¹⁴ permaneceram somente em observação por 90 dias. Já os grupos **Cir**^{8t} e **Cir**^{14t} foram submetidos ao tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica de rato, pelo mesmo período.

Após o período de indução da fibrose (8 semanas) e cirrose (14 semanas), um animal de cada um desse grupo foi eutanasiado seguindo protocolo padrão do CEP e submetidos a análise macro e microscópica visando observar características peculiares a estas lesões..

3.4.2 Preparo das Células

Para terapia celular, células-tronco de membrana amniótica que estavam congeladas e armazenadas no nitrogênio líquido foram submetidas ao processo de descongelamento rápido. As células após descongelamento rápido foram mantidas no meio descrito acima.

Antes das células serem utilizadas na terapia celular as mesmas são submetidas a análise da presença de micoplasma seguindo protocolo descrito por Roulland et al., 1994 e, Uphoff, Drexler , 2014.

3.4.3 Terapia celular

Para a terapia celular aproximadamente 1×10^6 células-tronco provenientes de membrana amniótica de ratas transduzidas com EGFP foram injetadas através da via endovenosa, utilizando-se o acesso pela veia da cauda.

3.5 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS APÓS TERAPIA CELULAR UTILIZANDO AS CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Todos animais foram monitorados através de exame clínico e pesados uma vez por semana. Durante o período de indução e após o tratamento os animais foram submetidos a coleta de sangue, como mostra a Figura 7, sendo o procedimento descrito no item 3.5.1. Após o período de terapia, os animais foram eutanasiados, sendo os procedimentos descritos no item 3.5.2.

3.5.1 Coleta de Sangue e Análise Bioquímica

A coleta sanguínea foi realizada logo antes do início da indução experimental, e a cada 30 dias, até o final da indução, para obtenção de soro a ser utilizado nas análises bioquímicas. Após a terapia celular, a coleta de sangue foi sendo realizada a quinzenalmente.

Para este procedimento, a contenção do animal foi realizada em sacos adaptados com uma abertura frontal para respiração (Figura 7A). Então, a cauda foi submetida à irradiação por luz infravermelha (Philips, São Paulo, Brasil) para promoção de vasodilatação, seguida por assepsia com álcool 70 % (Figura 7B). Após identificação da veia da cauda, a venopunção foi realizada através de agulhas 10 x 4,5 (26 G) (BD PrecisionGlide, São Paulo, Brasil),

previamente lavadas com EDTA (Merck, São Paulo, Brasil), na região medio-caudal da cauda (Figura 7C). Conforme o sangue era obtido, a cauda foi novamente submetida a irradiação pela luz, e massageada da base para a ponta (Figura 7D). O sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta (Eppendorf, São Paulo, Brasil) com ponteiros de 200 µl, e transferido para microtubos (Eppendorf) (Figuras 7E e 7F).

Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm para obtenção do soro, e então congelado em freezer -80°C para análise posterior do perfil bioquímico.

Figura 7 - Método de coleta de sangue pela veia da cauda em ratos.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Saco de contenção adaptado. **B)** Exposição da cauda a luz infravermelha. **C)** Punção da cauda com agulha 10 x 4,5 mm. **D)** Massagem da base para a ponta da cauda. **E)** Coleta de sangue com pipeta. **F)** Armazenamento em microtubo identificado.

As análises bioquímicas foram realizadas após o término do projeto utilizando-se kits de reagentes comerciais (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil), para os parâmetros: aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), albumina e proteínas totais. Para cada parâmetro, foram selecionadas três amostras de cada animal, sendo feita uma análise no

início do experimento; a segunda logo após o período de indução da fibrose ou cirrose hepática; e a terceira no final do período da terapia. As análises foram realizadas em aparelho semi-automatizado (Bio 200L, BioPlus, São Paulo, SP).

3.5.2 Análise Macroscópica do Fígado

Após o período pós-terapia de 90 dias, os animais restantes foram eutanasiados para coleta de material e biometria das vísceras.

A eutanásia foi feita em câmara de dióxido de carbono. Os animais foram pesados, e então foi realizada uma incisão subxifóidea com lâmina de bisturi para visualização da cavidade abdominal.

O fígado foi isolado, analisado macroscopicamente como, e as amostras foram picotadas em fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro, e então armazenadas nos fixadores Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) e Formol 10 % para análises histopatológicas por microscopia de luz e imunohistoquímica. O material fixado em Metacarn permaneceu durante 12 horas no fixador, enquanto as amostras armazenadas em formol permaneceram durante 24 horas. Após este período, as amostras foram acondicionadas em álcool 70 % até o processamento por diversas colorações histológicas como indicado no item 3.6, as análises histopatológicas segundo o item 3.7, e a imunohistoquímica, como mostrado em 3.8. Algumas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido para análise de expressão de marcadores em nível molecular por PCR em tempo real.

3.6 COLORAÇÕES HISTOLÓGICAS

Após fixação, as amostras foram processadas para microscopia de luz. O processo de inclusão foi realizado por desidratação em séries crescentes de álcoois (70 , 80, 90 e 100 %), diafanização em xilol e inclusão em parafina histológica paraplast (*Erv-plast* parafina histológica, *Easy Path*, Erviegas). Em seguida, foram realizados cortes de 5 µm em

micrótomo, e as lâminas foram desparafinadas em estufa 60 ° *overnight*, seguindo-se então as diferentes colorações histológicas.

3.6.1 Hematoxilina-Eosina (H.E.)

A coloração de hematoxilina-eosina foi realizada para análise histopatológica do órgão, permitindo a observação de alterações celulares e teciduais, assim como graduação da fibrose/cirrose pelo método de Ishak et al. (1995).

O processamento foi feito pela desparafinização das lâminas em xilol, e reidratação em séries decrescentes de álcoois (100, 90, 80 e 70 %). O material foi então corado pela hematoxilina e pela eosina, seguido de montagem com lamínulas utilizando meio Permount (Fisher Scientific, New Jersey, U.S.A.)

3.6.2 Picrosírius

A coloração de picrosírius foi realizada para marcação do colágeno tecidual, permitindo morfometria para quantificação das fibras colágenas, mensurando-se assim o grau de comprometimento hepático; tal como estadiamento da fibrose/cirrose pelo método de Ishak et al. (1995).

O processamento foi feito pela desparafinização das lâminas em xilol, e reidratação em séries decrescentes de álcoois (100, 90, 80 e 70 %). O material foi então passado em ácido fosfomolibdico a 4 %, e corado pelo picrosírius, seguido de montagem com lamínulas.

3.6.3 Alcian Blue

A coloração de *Alcian Blue* foi realizada para observação de mucopolissacarídeos ácidos no tecido hepático.

O processamento foi feito pela desparafinização das lâminas em xilol, e reidratação em séries decrescentes de álcoois (100, 90, 80 e 70 %). O material foi então corado pelo *Alcian Blue*, com fundo de coloração pela floxina, sendo seguido de montagem com lamínulas.

3.6.4 Ácido Periódico-Schiff (P.A.S.)

A coloração de ácido periódico - Schiff (P.A.S.) foi realizada para observação de glicogênio e mucopolissacarídeos neutros no tecido hepático.

O processamento foi feito pela desparafinização das lâminas em xilol, e reidratação em séries decrescentes de álcoois (100, 90, 80 e 70 %). O material foi então corado pelo ácido periódico e pelo reagente de Schiff, sendo feita ativação por sequências de lavagens em água sulfurosa, e o fundo da coloração foi feito pela hematoxilina, seguido de montagem com lamínulas.

3.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

3.7.1 Estadiamento e Graduação da Cirrose

Os critérios de graduação e estadiamento foram estabelecidos por Knodell et al. (1981) e modificados por Ishak et al. (1995).

A graduação da fibrose/cirrose hepática foi realizada com base no índice de atividade histológica (IAH), o qual classifica as lesões hepáticas de acordo com diversos fatores relacionados a necrose e inflamação tecidual, estabelecendo-se um escore final que varia de 1

a 18 (Quadro 1). Para esta análise, foram utilizadas lâminas coradas por hematoxilina-eosina, analisadas em diversos aumentos (4, 10, 20 e 40x) em microscópio de luz (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera (DS-Ri1, Nikon, Tóquio, Japão).

O estadiamento da fibrose/cirrose hepática foi realizado através de observação da intensidade de deposição colágeno parenquimal, em lâminas coradas por picrosírius, estabelecendo-se um escore de 1 a 6 (Quadro 2) Esta análise foi realizada em aumentos de 4 e 10x, em microscópio de luz. Todas as análises foram realizadas em teste duplo cego, no qual nenhum dos pesquisadores que realizaram os testes pôde observar a identificação do animal.

Quadro 1- Índice de atividade histológica (IAH) e escores de graduação da fibrose/cirrose hepática.

Necrose piecemeal (Hepatite de Interface)	Escore
Ausente	0
Leve (focal, poucas áreas portais)	1
Leve/moderada (focal, diversas áreas portais)	2
Moderada (contínua, < 50 % das regiões portais e sinusóides)	3
Severa (contínua, > 50 % das regiões portais e sinusóides)	4
Necrose confluyente	Escore
Ausente	0
Necrose confluyente focal	1
Necrose de zona 3 em poucas regiões	2
Necrose de zona 3 em muitas regiões	3
Necrose de zona 3 + ponte portal-central ocasional	4
Necrose de zona 3 + ponte portal-central múltipla	5
Necrose paracinar ou multiacinar	6
Necrose lítica focal, apoptose e inflamação focal	Escore
Ausente	0
Um foco ou menos por campo (10x)	1
Dois a quatro focos por campo (10x)	2
Cinco a dez focos por campo (10x)	3
Mais de dez focos por campo (10x)	4
Inflamação Portal	Escore
Ausente	0
Leve, algumas ou todas as regiões portais	1
Moderada, algumas ou todas as regiões portais	2
Moderada/severa, todas as regiões portais	3
Severa, todas as regiões portais	4
Escore máximo	18

Fonte: Adaptada de Ishak et al. (1995).

Quadro 2- Escores para estadiamento da fibrose/cirrose hepática, de acordo com a expansão do colágeno.

Alterações estruturais, fibrose e cirrose	Escore
Ausência de fibrose	0
Expansão fibrosa em algumas áreas portais, com ou sem pequenos septos	1
Expansão fibrosa de muitas áreas portais, com ou sem pequenos septos	2
Expansão fibrosa de muitas áreas portais com ponte entre espaços portais ocasional	3
Expansão fibrosa de áreas portais com acentuadas pontes entre espaços portais, e entre espaço portal - centrolobular	4
Acentuadas pontes entre espaços portais e entre espaço portal - centrolobular com nódulos ocasionais (cirrose incompleta)	5
Cirrose	6
Escore máximo	6

Fonte: Adaptada de Ishak et al. (1995).

3.7.2 Análise das Alterações Celulares

As alterações celulares dos tecidos hepáticos foram analisadas através de lâminas coradas por hematoxilina-eosina (H.E.), em microscópio de luz, em diversos aumentos (4, 10, 20, 40x). Foi analisada a presença de: megalocitoses, esteatose, vacuolizações, células ovais, deposição de hemossiderina, figuras mitóticas, inclusões eosinofílicas, células binucleadas, lesões nucleares e corpúsculos apoptóticos.

Estas alterações foram classificadas semi quantitativamente, estabelecendo-se escores de acordo com a frequência com que a alteração foi observada: 0 (ausência da alteração), + (alteração pouco presente), ++ (presença moderada da alteração), +++ (presença intensa da alteração). Todas as análises foram realizadas em teste duplo cego.

3.7.3 Proliferação de Ductos

A proliferação de ductos foi avaliada através da coloração de hematoxilina-eosina (H.E.) em diferentes aumentos, estabelecendo-se um escore semelhante ao utilizando para as alterações celulares. As análises foram realizadas em teste duplo cego.

3.7.4 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros

Os mucopolissacarídeos ácidos foram analisados pela coloração de Alcian Blue, enquanto os mucopolissacarídeos neutros e o glicogênio foram observados pela coloração de ácido periódico-Schiff. Como controle para estas colorações, foi utilizado intestino de rato, visto que este tecido expressa normalmente os mucopolissacarídeos analisados. Para ambas as análises, foi utilizado microscópio óptico em diferentes aumentos, estabelecendo-se um escore semelhante ao utilizando para as alterações celulares e proliferação de ductos.

3.7.5 Morfometria do Colágeno Parenquimal

Para análise do tratamento sobre a fibrogênese hepática, os fígados foram submetidos à quantificação do colágeno interlobular e intralobular. A análise foi realizada em lâminas coradas por Picrosírius e observadas em microscópio óptico, sendo, para cada lâmina, tiradas 25 fotos no aumento de 20x para observação de colágeno interlobular; e 25 fotos no aumento de 40 x para colágeno intralobular. A quantificação foi realizada através de programa de computador Image J. Os valores foram expressos em porcentagem de colágeno em relação à área total analisada.

3.8 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunohistoquímica foi realizada com intuito de promover marcações para dois diferentes tipos de colágeno prevalentes na cirrose hepática: 1 e 3 utilizando os anticorpos: anti-colágeno 1 e anti-colágeno 3 (Abcam, abcam ab34710 e abcam ab7778, respectivamente); para o marcador de ativação de células estreladas hepáticas α -SMA (α -actina de músculo liso) (Sigma-Aldrich, a2547); e para PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, PC10: sc-56), importante marcador de proliferação celular. As diluições utilizadas destes anticorpos foram de: PCNA (1:500); colágeno-1 (1:100); colágeno-3 (1:500) e α -SMA (1:500).

Para cada análise imunohistoquímica, foi utilizada uma lâmina silanizada com cortes de fígado parafinados. As lâminas foram submetidas a aquecimento em estufa durante 40 minutos a 60°C e a três lavagens em xilol de 10 minutos cada para desparafinização. A seguir, foram reidratadas em séries decrescentes de álcool (100, 90, 80, 70 %), de 10 minutos cada), lavadas em água destilada, e submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato a 95°C, aquecido em panela à vapor. Após resfriamento em temperatura ambiente e lavagem em PBS, os tecidos passaram por bloqueio da peroxidase endógena com duas lavagens de 15 minutos cada com água oxigenada 3 %, intercaladas por banho de 5 minutos em PBS, e bloqueio de reações inespecíficas em albumina sérica bovina (BSA 10 %) por 1 hora em geladeira. Após nova lavagem em PBS, as lâminas foram então incubadas com anticorpo primário *overnight* em câmara úmida na geladeira. No dia seguinte (após 14-18 horas), foram realizadas três lavagens em PBS de 5 minutos cada, e incubação com anticorpo secundário Advanced *HRP link* e Advanced *Enzyme link* (DAKO, CA, USA) durante 30 minutos cada, e com lavagens com PBS de 5 minutos cada entre um e outro. Finalmente, após três lavagens em PBS de 5 minutos, foi feita revelação com DAB (DAKO), e as lâminas foram então contra-coradas por hematoxilina durante 3 a 4 minutos, lavadas em água corrente, e montadas com PermOUNT após séries de 10 minutos de alcoóis crescentes (70, 80, 90, 100 %) e três séries de xilol para desidratação do material.

As lâminas marcadas para PCNA foram analisadas por contagem de 1000 células, obtendo-se porcentagem de células marcadas em relação ao total analisado. Já os outros marcadores (colágeno-1, colágeno-3 e α -SMA) foram analisados semi-quantitativamente por escores de 0 (ausente) a 3 (marcação intensa).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas, os dados foram testados para normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Para os testes não paramétricos (sem normalidade), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, para valores numerais ou ordinais. Os animais incluídos na mortalidade do experimento não foram incluídos nas análises estatísticas, assim como eutanasiados logo após o período de indução da fibrose/cirrose, sendo estes apenas analisados para verificação do sucesso da indução da doença.

Os gráficos de cada análise foram elaborados utilizando-se o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA)

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVO CELULAR DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE RATOS

A cultura de membrana amniótica apresentou ótimo crescimento e viabilidade celular, após o descongelamento. As células transduzidas por EGFP apresentaram crescimento ainda maior que as não transduzidas e ambas apresentaram morfologia fibroblastóide como pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Fotomicrografias das células-tronco de membrana amniótica de rata.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B** - células-tronco de membrana amniótica de rata. **C e D** - células-tronco de membrana amniótica de rata transduzida com EGFP. **A e C** - Aumento de 40 x. **B e D** - Aumento de 100 x.

A figura 9 representa as células transduzidas por GFP.

Figura 9 – Fotomicrografia das células-tronco de membrana amniótica de ratas transduzidas com o retrovírus carregando o gene EGFP por microscopia óptica de fluorescência utilizando os filtros DAPI e FITC.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Aumento de 200x. **B)** Aumento de 400x.

4.2 ANÁLISE DOS ANIMAIS APÓS INDUÇÃO DA FIBROSE/CIRROSE

A fibrose e cirrose hepática foram induzidas com sucesso após administração de tioacetamida pelos períodos de 8 ou 14 semanas, respectivamente e os resultados obtidos que caracterizam estas lesões foram analisados pro macroscopia e microscopia como segue abaixo.

4.2.1 Análise Macroscópica

Os achados macroscópicos dos animais eutanasiados imediatamente após os períodos de indução da fibrose/cirrose permitem visualizar fígado de aspecto nodular e friável após o período de indução, sem alterações na topografia dos órgãos. A intensidade das alterações é

maior nos grupos induzidos por 14 semanas em relação aos grupos de 8 semanas como esperado (Figura 10).

Figura 10 - Macroscopia dos fígados dos animais após o período de indução experimental.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Fígado de animal controle sem estresse de manejo **B)** Fígado de animal controle com aplicação de solução fisiológica. **C)** Fígado de animal induzido a fibrose, com alterações sutis em superfície do órgão e aspecto friável. **D)** Fígado de animal induzido a cirrose, com aspecto nodular e friável do órgão.

4.2.2 Análise Histopatológica da Indução da Fibrose e Cirrose Hepáticas

A fibrose e cirrose hepática foram induzidas com sucesso após administração de tioacetamida pelos períodos de 8 ou 14 semanas, respectivamente. Nos animais induzidos a fibrose, as alterações foram sutis, caracterizando por baixa deposição de colágeno como observado na histopatologia, porém com diversas alterações celulares (Figura 11C e D). Já a cirrose hepática apresentou disposição clássica, havendo modificações nas unidades histológicas do fígado, com formação de nódulos de regeneração e desarranjo dos hepatócitos, além das alterações celulares observadas pela histopatologia (Figura 11E e F). Nas lâminas coradas pelo Picrosírius, é possível observar claramente a deposição de tecido conjuntivo, resultando na desorganização lobular e vascular do órgão (Figura 12E e F).

Figura 11 - Fotomicrografias de fígados submetidos a fibrose e cirrose hepática, pela coloração de hematoxilina eosina.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B)** Animal controle, mostrando fígado em sua morfologia normal. **C e D)** Animal induzido a fibrose após 8 semanas de aplicação de tioacetamida. Em C, seta preta = preença de necrose piecemeal e seta branca = hemossiderina. Em D, seta preta = vacuolização, seta branca = hemossiderina, cabeça de seta preta = célula binucleada, cabeça de seta branca = balonização indicando necrose. **E e F)** Animal induzido a cirrose hepática após 14 semanas de aplicação de tioacetamida. Em E, destaque indica nódulo regenerativo formando ilha de hepatócitos, seta preta = células ovais, seta branca = depósito de hemossiderina, cabeça de seta preta = necrose focal, cabeça de seta branca = figura de mitose. Em F, é possível notar necrose generalizada de toda a região fotografada. A, C e E - Aumento de 100 x. B, D e F - Aumento de 400 x.

Figura 12 - Fotomicrografias de fígados submetidos a fibrose e cirrose hepáticas, pela coloração de Picrosírius.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B)** Animal controle, sem deposição de tecido conjuntivo. **C e D)** Animal induzido a fibrose após 8 semanas de aplicação de tioacetamida, com baixa deposição de tecido conjuntivo. **E e F)** Animal induzido a cirrose após 14 semanas de aplicação de tioacetamida, com intensa deposição de tecido conjuntivo e desorganização lobular. A, C e D - Aumentos de 10 x. B, D e F - Aumentos de 40 x.

4.3 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR

4.3.1 Análise Macroscópica

Após a eutanásia, a análise macroscópica dos animais induzidos a cirrose hepática (14 semanas de indução) demonstrou evolução favorável dos animais submetidos à terapia celular. O fígado dos animais tratados (Figura 13 D) apresentou-se menos friável e com aspecto nodular menos visível em relação aos animais não tratados (Figura 13 C). Para os animais induzidos a fibrose (8 semanas de indução), houve pouca diferença macroscópica entre os animais tratados (Figura 13 F) ou não tratados (Figura 13 E).

Figura 13 - Macroscopia dos fígados dos animais após o período de 90 dias pós-terapia.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Fígado de animal controle sem estresse de manejo **B)** Fígado de animal controle com aplicação de solução fisiológica. **C)** Fígado de animal induzido a cirrose não tratado, de aspecto nodular e friável. **D)** Fígado de animal induzido a cirrose e tratado, com aspecto menos friável que o animal não tratado. **E)** Fígado de animal induzido a fibrose não tratado, de aspecto próximo a normalidade. **F)** Fígado de animal induzido a fibrose, tratado, com aspecto próximo a normalidade.

4.3.2 Pesagem dos Animais

O peso dos animais foi monitorado durante o período experimental onde foi observado que, nos grupos controles (Ct 0, Ct 8, Ct 14), houve aumento de peso dos animais durante todo o período experimental, sendo mais acentuado em Ct 0, devido à ausência de estresse de manejo. Já nos animais induzidos a fibrose e cirrose hepáticas (Cir 8, Cir 8t, Cir 14, Cir 14t), os animais mantiveram seus pesos iniciais durante boa parte da indução pela tioacetamida, tendo um declínio maior das medidas conforme a proximidade do final do experimento. Após o tratamento, porém, os animais voltaram a ganhar peso normalmente, sendo que os animais tratados com células-tronco mostraram um ganho mais acentuado no momento imediato após a terapia (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Pesos dos animais submetidos a 8 semanas de experimentação.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: Ct 0 = Controle manejo. Ct 8 = Controle fibrose. Cir 8 = Fibrose não tratada. Cir 8t = Fibrose tratada.

Gráfico feito em software Graphpad

Gráfico 2 - Pesos dos animais submetidos a 14 semanas de experimentação.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: Ct 0 = Controle manejo. Ct 14 = Controle fibrose. Cir 14 = Cirrose não tratada. Cir 14t = Cirrose tratada. Gráfico feito em software Graphpad

4.3.3 Mortalidade

A mortalidade durante o experimento foi de três (3) animais, decorrentes da cirrose hepática (10%). Um animal também foi eutanasiado fora do protocolo devido a presença de necrose da cauda após repetitiva venopunção.

4.3.4 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas de ambos os grupos experimentais, induzidos a fibrose e cirrose, não mostrou diferenças estatísticas significativas. Porém, é possível notar algumas tendências nos valores do experimento. A aspartato aminotransferase (AST) diminuiu em todos os grupos experimentais, exceto no grupo induzido a cirrose e tratado com células-tronco, no qual houve um aumento ($196,4 \pm 65,19$ para $314,3 \pm 0$) após o período de terapia.

Para todos os grupos, houve aumento nos valores de albumina (ALB) e proteínas totais (PT), enquanto os valores de fosfatase alcalina (FA) diminuíram após o período pós-terapia, tanto nos animais tratados quando naqueles não tratados. Infelizmente, as amostras da 1ª coleta não obtiveram leitura para AST, devido ao tempo de armazenamento. As análises bioquímicas estão representadas pela Tabela 1, e pelo gráfico 3.

Tabela 1 – Análises bioquímicas dos diferentes grupos experimentais em diversos momentos, sendo a 1ª amostra no início do experimento; a 2ª amostra logo após a indução da doença; e a 3ª amostra após o período de 90 dias pós-indução e terapia celular.

Grupo	AST			ALB			PT			FA		
	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra
Ct 0	-	68 ± 0	104,8 ± 0	1,87 ± 0	3,4 ± 0	4,25 ± 0	5,7 ± 0	6 ± 0	8,1 ± 0	24,8 ± 0	41,4 ± 0	49,7 ± 0
Ct 8	-	104,7 ± 51,90	65,4 ± 3,67	2,2 ± 0,29	2,33 ± 0,14	4,18 ± 0,02	6,05 ± 0,35	5,65 ± 0,35	6,7 ± 0,42	37,25 ± 17,60	45,55 ± 5,86	37,25 ± 5,86
Cir 8	-	116,96 ± 43,67	69,76 ± 6,58	3,59 ± 0,92	2,93 ± 0,19	3,9 ± 1,03	4,36 ± 1,25	5,72 ± 1,38	8,3 ± 1,20	56,34 ± 10,82	60,07 ± 14,17	23,21 ± 9,09
Cir 8t	-	106,5 ± 16,03	78,56 ± 36,31	2,69 ± 0,98	3,02 ± 0,28	3,77 ± 0,37	5,84 ± 0,42	6,3 ± 0,60	7 ± 0,29	64,64 ± 22,11	35,86 ± 4,79	33,1 ± 11,73
Ct14	-	65,4 ± 3,67	70,4 ± 4,12	2,88 ± 0,18	3,25 ± 0,55	4,06 ± 0,24	7,55 ± 0,07	6,3 ± 1,13	7,85 ± 1,62	20,31 ± 0,58	53,85 ± 5,86	49,79 ± 35,21
Cir 14	-	150,1 ± 32,40	118,7 ± 52,50	2,57 ± 0,52	2,39 ± 0,27	3,49 ± 0,95	6,46 ± 1,00	3,63 ± 1,41	7,6 ± 0,60	46,93 ± 25,33	30,33 ± 17,27	38,63 ± 9,58
Cir 14t	-	196,4 ± 65,19	314,3 ± 0	2,27 ± 0,07	2,81 ± 0,14	3,58 ± 0,27	5,3 ± 0,42	4,4 ± 1,13	7,4 ± 0,28	28,95 ± 5,86	140,95 ± 82,09	33,1 ± 11,73

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. AST = aspartato aminotransferase. ALB = albumina. PT = proteínas totais. FA = fosfatase alcalina.

Gráfico 3 – Análises bioquímicas dos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepáticas.

A **B** **C** **D**

E

F

G

H

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. AST = aspartato aminotransferase. ALB = albumina. PT = proteínas totais. FA = fosfatase alcalina.

4.3.5 Estadiamento e Graduação da Fibrose/Cirrose Após Terapia Celular

A graduação e o estadiamento da cirrose não mostraram diferenças estatísticas significativas. Porém, novamente foi possível notar uma tendência em alguns grupos. Nos animais induzidos a fibrose hepática, houve redução na graduação ($4,6 \pm 0,54$ para $4,25 \pm 0,5$) e no estadiamento ($1,6 \pm 0,54$ para $1,5 \pm 0,57$) após a terapia celular. Nos animais induzidos a cirrose hepática, também houve redução na graduação (10 ± 1 para $9 \pm 2,82$) e no estadiamento ($3,66 \pm 0,57$ para $3,5 \pm 0,70$) após terapia celular. A graduação e o estadiamento estão representados pela Tabela 2, e pelos Gráficos 4 e 5.

Tabela 2 – Graduação e Estadiamento da fibrose e cirrose hepáticas, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995).

Grupo	Graduação	Estadiamento
Ct 0	0	0
Ct 8	0	0
Cir 8	$4,6 \pm 0,54$	$1,6 \pm 0,54$
Cir 8t	$4,25 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,57$
Ct 14	0	0
Cir 14	10 ± 1	$3,66 \pm 0,57$
Cir 14t	$9 \pm 2,82$	$3,5 \pm 0,70$
Valor Máximo	18	6

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada.

Gráfico 4 – Graduação dos grupos induzidos a fibrose e cirrose hepática, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995).

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada

Gráfico 5 – Estadiamento dos grupos induzidos a fibrose e cirrose hepática, segundo o método de Knodell et al. (1981), adaptado por Ishak et al. (1995).

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada

4.3.6 Alterações Celulares

As diversas alterações celulares observadas após indução de fibrose/cirrose estão exemplificadas pela Figura 14.

Figura 14- Fotomicrografias exemplificando alterações celulares observadas em tecido hepático de diferentes animais submetido a a indução de fibrose e cirrose, pela coloração de HE, indicadas por setas. Aumento de 400x.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Megalocitose. **B)** Esteatose. **C)** Vacuolização. **D)** Células ovais. **E)** Hemossiderina. **F)** Figura mitótica. **G)** Inclusão eosinofílica. **H)** Célula binucleada. **I)** Lesão nuclear. **J)** Corpúsculo apoptótico

As diferenças para cada alteração celular entre os grupos tratados e não tratados não foi estatisticamente significativa para nenhum parâmetro. Porém, foi possível notar algumas tendências em alguns grupos. Nos animais induzidos à fibrose hepática, foi possível notar aumento da megalocitose, células ovais e lesões nucleares; e redução da esteatose, vacuolização, hemossiderina, figuras mitóticas, inclusões eosinofílicas, células binucleadas, e corpúsculos apoptóticos. Já nos animais induzidos à cirrose hepática, notou-se diminuição da esteatose, células ovais, hemossiderina, células binucleadas, e aumento da vacuolização, figuras mitóticas, lesões nucleares e corpúsculos apoptóticos. Estas alterações estão representadas pela Tabela 3, e pelo Gráfico 6.

Tabela 3 – Alterações celulares observadas em diferentes grupos experimentais.

Grupo	Megalocitose	Esteatose	Vacuolização	Células Ovais	Hemossiderina	Figura Mitótica	Inclusão Eosinofílica	Células Binucleadas	Lesão Nuclear	Corpúsculo Apoptótico	Proliferação de Ductos
Ct 0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Ct 8	1 ± 0	0,5 ± 0,70	0	1 ± 0	0	0	1 ± 0	0,5 ± 0,70	0	0	0
Cir 8	1,9 ± 0,44	2 ± 0,70	0,6 ± 0,89	1,2 ± 0,44	1,2 ± 0,44	0,4 ± 0,54	1 ± 0	1,2 ± 0,44	1 ± 0	0,4 ± 0,54	0,8 ± 0,44
Cir 8t	2 ± 0	1,5 ± 0,57	0,5 ± 0,57	1,25 ± 0,5	0	0	0	1,5 ± 0,57	1,25 ± 0,5	0,25 ± 0,5	0
Ct 14	1 ± 0	1 ± 1,41	0	1 ± 0	0	0	1 ± 0	1 ± 0	0,5 ± 0,70	0	0
Cir 14	2,5 ± 0,57	1,3 ± 0,57	1 ± 0	3 ± 0	2 ± 1	0,25 ± 0,5	1,5 ± 0,57	2 ± 0	1,6 ± 0,57	1 ± 0	1,3 ± 1,52
Cir 14t	2,5 ± 0,7	1 ± 0	2 ± 1,41	2 ± 0	0,5 ± 0	0,5 ± 0,577	1,5 ± 0,7	1,5 ± 0,7	2 ± 1,41	1,5 ± 2,12	0,5 ± 0,7

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

Gráfico 6 – Alterações celulares observadas nos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepáticas.

G **H** **I** **J** **K** **L**

M **N** **O** **P** **Q** **R**

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

4.3.7 Proliferação de Ductos

A proliferação de ductos está representada pela Figura 15.

Figura 15 - Fotomicrografia de tecido hepático indicando proliferação de ductos biliares. Coloração de HE.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Aumento de 200x. **B)** Aumento de 400x.

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nas proliferações de ductos. No entanto, aparentemente houve uma tendência a redução na presença de proliferações após terapia celular tanto nos grupos induzidos a fibrose quanto a cirrose hepáticas. Estas alterações estão representadas pela Tabela 4 e pelo Gráfico 7.

Tabela 4 – Proliferações de ductos observadas em diferentes grupos experimentais.

Grupo	Proliferação de Ductos
Ct 0	1
Ct 8	0
Cir 8	$0,8 \pm 0,44$
Cir 8t	0
Ct 14	0
Cir 14	$1,3 \pm 1,52$
Cir 14t	$0,5 \pm 0,7$

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

Gráfico 7 – Proliferações de ductos observadas em grupos induzidos à fibrose e cirrose hepáticas.

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

4.3.8 Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros

A presença de mucopolissacarídeos ácidos e neutros/glicogênio no tecido hepático está representada pelas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 16 - Fotomicrografias destacando mucopolissacarídeos ácidos visualizados pela coloração de Alcian Blue.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B)** Intestino utilizado como controle. **C e D)** Tecido hepático de animais induzidos a fibrose, com deposição discreta de mucopolissacarídeos ácidos. **E e F)** Tecido hepático de animais induzidos a cirrose, com deposição intensa de mucopolissacarídeos ácidos. A, C e E - aumentos de 200x. B, D e F - aumentos de 400x.

Figura 17 - Fotomicrografias destacando mucopolissacarídeos neutros e glicogênio visualizados pela coloração de ácido periódico-Schiff.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B)** Intestino utilizado como controle. **C e D)** Tecido hepático de animais induzidos a fibrose, com deposição discreta de mucopolissacarídeos neutros. **E e F)** Tecido hepático de animais induzidos a cirrose, com deposição moderada de mucopolissacarídeos neutros. A, C e E - aumentos de 200x. B, D e F - aumentos de 400x.

Não houve diferenças estatisticamente significativas na presença de mucopolissacarídeos ácidos e neutros ou glicogênio nos animais tratados ou não tratados. Houve, porém, uma tendência a redução de ambos após período de terapia celular. Estas alterações estão representadas pela Tabela 5 e pelos Gráficos 8 e 9.

Tabela 5 –Mucopolissacarídeos Ácidos e Neutros em diferentes grupos experimentais.

Grupo	Mucopolissacarídeos Ácidos	Mucopolissacarídeos Neutros
Ct 0	1 ± 0	0
Ct 8	1 ± 0	0
Cir 8	0,8 ± 0,44	1,6 ± 0,54
Cir 8t	0,75 ± 0,5	0,75 ± 0,5
Ct 14	0	1 ± 0,70
Cir 14	2,3 ± 1,41	3 ± 0
Cir 14t	1,5 ± 2,12	1,5 ± 0,70

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

Gráfico 8 – Mucopolissacarídeos ácidos nos grupos relacionados à indução de fibrose e cirrose hepática.

Fonte: (RUI, 2014).

Não houve diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

Gráfico 9 – Mucopolissacarídeos neutros nos grupos relacionados à indução de cirrose hepática.

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração.

4.3.8 Morfometria do Colágeno Parenquimal

O colágeno parenquimal foi observado através da coloração por Picrosírius, tal como observado na Figura 18.

Figura 18 - Fotomicrografias destacando colágeno parenquimal em fígado cirrótico pela coloração de Picrosírius.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A)** Colágeno interlobular, observado em aumento de 200x. **B)** Colágeno intralobular, observado em aumento de 400x.

Nos animais submetidos a fibrose hepática, houve maior deposição de colágeno intralobular nos animais submetidos à terapia celular em relação aos não tratados ($0,072 \pm 0,05$ % e $0,051 \pm 0,042$ %, respectivamente). O colágeno interlobular não teve alterações estatisticamente significativas ($0,193 \pm 0,160$ e $0,234 \pm 0,106$, respectivamente)

Nos animais submetidos a cirrose hepática, houve menor deposição de colágeno intralobular nos animais submetidos à terapia celular em relação aos não tratados ($0,05 \pm 0,022$ % e $0,209 \pm 0,123$ %, respectivamente) e também de colágeno interlobular ($0,42 \pm 0,34$ % e $1,39 \pm 0,84$ %, respectivamente). Estas alterações estão expressas na Tabela 6 e nos Gráficos 10 e 11.

Tabela 6 – Proporção volumétrica do colágeno inter e intralobular depositado no tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática, após período de terapia celular.

Tipo de Colágeno	Ct 0	Ct 8	Cir 8	Cir 8t	Ct 14	Cir 14	Cir 14t
Colágeno Interlobular (%)	$0,027 \pm 0$	$0,06 \pm 0,006$	$0,234 \pm 0,106$	$0,193 \pm 0,160$	$0,113 \pm 0,038$	$1,39 \pm 0,84$	$0,42 \pm 0,34^b$
Colágeno intralobular (%)	$0,023 \pm 0$	$0,076 \pm 0,059$	$0,051 \pm 0,042$	$0,072 \pm 0,05^a$	$0,039 \pm 0,010$	$0,209 \pm 0,123$	$0,05 \pm 0,022^b$

Fonte: (RUI, 2014).

^a diferença significativa em relação ao Cir 8; ^b diferença significativa em relação ao Cir 14, $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada.

Gráfico 10 – Proporção volumétrica do colágeno interlobular depositado no tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática, após período de terapia celular.

Fonte: (RUI, 2014).

* diferença significativa em relação ao Cir 14; $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada.

Gráfico 11 – Proporção volumétrica do colágeno intralobular depositado no tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática, após período de terapia celular.

Fonte: (RUI, 2014).

* diferença significativa em relação ao Cir 8 e Cir 14 em A e B, respectivamente, $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada.

4.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

As marcações para imunohistoquímica estão representadas pela Figura 20.

Figura 20 - Marcações imunohistoquímicas exemplificadas em tecido hepático de diferentes animais submetidos à fibrose e cirrose hepática.

Fonte: (RUI, 2014).

Legenda: **A e B)** PCNA, diluição 1:500, com destaque para marcação de núcleos (seta). **C e D)** Colágeno 1, com marcação intracelular (seta preta) e marcação de matriz extracelular (seta branca). **E e F)** Colágeno 3, com marcação intracelular (seta preta) e marcação de matriz extracelular (seta branca). **G e H)** α -SMA, com destaque para marcação (seta). A, C, E e G = aumentos de 20 x. B, D, F e H = aumentos de 40 x.

Não houveram diferenças estatísticas nos valores de PCNA, α -SMA, colágeno 1 e 3 para os animais tratados para fibrose e cirrose em relação aos não tratados. Houve, porém, uma tendência a um aumento do PCNA e redução dos colágenos 1 e 3 e α -SMA. As análises das imunohistoquímicas estão representadas pela Tabela 7, e pelos Gráficos 14 e 15.

Tabela 7 – Valores da expressão de PCNA, α -SMA, colágeno 1 e colágeno 3 em tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática, após período de terapia celular.

Grupo	PCNA	α -SMA	Colágeno 1	Colágeno 3
Ct0	8,20 $\pm$ 0 %	1 $\pm$ 0	0	1 $\pm$ 0
Ct8	8,00 $\pm$ 1,98 %	1,5 $\pm$ 0,70	1 $\pm$ 1,41	1,5 $\pm$ 0,70
Cir8	24,80 $\pm$ 5,84	1,8 $\pm$ 0,83	2,6 $\pm$ 0,54	2 $\pm$ 0,70
Cir8t	25,75 $\pm$ 5,17 %	1,5 $\pm$ 0,57	2 $\pm$ 0,81	1,5 $\pm$ 0,57
Ct14	21,00 $\pm$ 0 %	0,5 $\pm$ 0,70	1 $\pm$ 0	1 $\pm$ 0
Cir14	37,00 $\pm$ 3,48 %	2 $\pm$ 1	2,33 $\pm$ 0,57	2,66 $\pm$ 0,57
Cir14t	47,77 $\pm$ 11,79 %	1,66 $\pm$ 0,57	2,33 $\pm$ 0,57	1,55 $\pm$ 0,57

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Ct 14 = controle cirrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração. PCNA expresso em %.

Gráfico 12 – Expressão da marcação de PCNA, α -SMA, colágeno 1 e colágeno 3 em tecido hepático de animais submetidos a fibrose e cirrose hepática.

A

B

C **D** **E** **F** **G** **H**

Fonte: (RUI, 2014).

Não houveram diferenças estatísticas significativas, $p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis. Ct 0 = controle manejo. Ct 8 = controle fibrose. Cir 8 = fibrose não tratada. Cir 8t = fibrose tratada. Ct 14 = controle cirrose. Cir 14 = cirrose não tratada. Cir 14t = cirrose tratada. Os valores variaram de acordo com os escores: 0 = ausência da alteração. 1 = pouca presença da alteração. 2 = presença moderada da alteração. 3 = presença severa da alteração. PCNA expresso em %.

5 DISCUSSÃO

A cirrose hepática é, atualmente, a 14ª causa mais comum de mortalidade no mundo, podendo alcançar uma mortalidade de 57 % ao longo de um ano, dependendo do estágio de evolução (TSOCHATZIS, BOSCH, BURROUGHS, 2014). No Brasil, a taxa de mortalidade devido a cirrose hepática varia de 14,37 % a 35,86 % de acordo com a região, e sendo a maior causa o alcoolismo (LESSA, 1996). Na medicina veterinária, a etiologia é bastante variável, podendo estar relacionada a infecções virais, leptospirose, drogas, fatores hereditários e autoimunidade, estando relacionada a um mau prognóstico devido aos poucos dados existentes referentes a terapia eficaz desta doença (DILL-MACKY, 1995; ROTHUIZEN, 2004; WATSON, 2004).

Ela está relacionada a doenças hepáticas crônicas, podendo ser multifatorial (ASRANI et al., 2013), e caracteriza-se por degeneração e necrose tecidual, com substituição de parênquima hepático por tecido fibroso e formação de nódulos regenerativos, com perda de função do órgão (ANTHONY et al., 1978; WANLESS et al., 2000; FERREL, 2000).

Dentre as formas de terapia sendo investigadas atualmente, está a terapia celular, que utiliza células-tronco de diversas origens para promover modulação de fatores inflamatórios, fibrogênicos, e assim resultar em regeneração hepática (CHIOZZI et al., 1997; FLOHR et al., 2009; HWANG et al., 2011; TAKAMI, TERA, SAKAIDA, 2012). As células-tronco de membrana amniótica têm sido amplamente estudadas, podendo liberar citocinas imunomoduladoras e anti-inflamatórias, além de fatores de crescimento e de proliferação (PARADOWSKA et al., 1997; STEED et al., 2008; PAROLINI et al., 2010).

Neste trabalho, células-tronco foram isoladas com sucesso da membrana amniótica de ratas *Wistar* seguindo protocolo descrito por Marcus et. Al. 2008, apresentando ótimo rendimento em cultura, morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico. De acordo com Marcus et al. (2008) que as isolaram inicialmente por através de explante de membrana amniótica de ratas, sendo também caracterizadas, apresentando marcadores de superfície CD29 e CD90, e se diferenciando nas linhagens adipogênica e osteogênica, podendo ser cultivadas por mais de 20 passagens sem perder sua plasticidade. Foram também consideradas seguras, não provocando rejeição e não provocando a formação de tumores (PAROLINI et al., 2008; SANT'ANNA et al., 2011). As células foram transduzidas por GFP para marcação, e então testadas para a presença de micoplasma através de PCR e apenas células negativas foram utilizadas pra a terapia celular. Como as células em questão já haviam sido

caracterizadas não desprendemos tempo para que estas fossem caracterizadas e apresentadas neste projeto.

A escolha da tioacetamida (TAA) em nosso trabalho para indução experimental da cirrose se deu devido a mesma ter sido amplamente utilizada em protocolos experimentais (FONTANA et al., 1996; WANG et al., 2000; HAKATEYAMA et al., 2002; SPIRA et al., 2002; DEKEL et al., 2003; IIMURO et al., 2003; GNAIKSY et al., 2004; CHILAKAPATI et al., 2005; LALEMAN et al., 2006; HAJOVSKY et al., 2012). Apesar de ser um agente hepatotóxico, que ao ser metabolizado, produz S-óxido de tioacetamida e S-dióxido de tioacetamida, sendo este último altamente reativo (CHILAKAPATI et al., 2005; HAJOVSKY et al., 2012) ela possui algumas vantagens quando comparadas com outros agentes como baixa mortalidade em relação ao tetracloreto de carbono (CCl_4) (LI; BENJAMIN; ALEXANDER, 2002), e capacidade de provocar quadro de cirrose clássica, caracterizada por necrose celular, fibrose, reorganização micronodular, proliferação de ductos, aumento de transaminases, peroxidação de membranas lipídicas, aumento de fosfatase alcalina e cirrose macronodular, formando nódulos regenerativos e necrose centrotubular (TREY; DAVIDSON, 1970; MULLER et al., 1996; SUN et al., 2000; HATAKEYAMA et al., 2002; LALEMAN et al., 2006). Segundo Rui et al. (2014), a cirrose produzida pela TAA não regride espontaneamente após um prazo de 90 dias, sendo uma metodologia eficaz para indução desta doença.

Neste trabalho, a TAA foi utilizada durante um período de 8 semanas para indução da fibrose, e 14 semanas para indução de cirrose, havendo sucesso na indução da doença, e apresentando taxa de mortalidade em torno de 10 % (3 animais). Como relatado em resultados, houve ainda, mortalidade de um animal por necrose da cauda, devido a repetidas venopunções para coleta de sangue pela veia da cauda. A escolha da indução da cirrose em 8 semanas é um período aceitável uma vez que Iimuro et al (2003) produziram fibrose hepática através da aplicação de TAA durante 7 semanas, não havendo regressão após 2 meses. Já a indução da cirrose hepática após 14 semanas da administração da TAA por diferentes vias, com índices de mortalidade variando entre 4 % e 16 % já é bem descrita (LALEMAN et al., 2006; LIMA et al., 2008; GUERRA et al., 2009; GU et al., 2010; RUI et al., 2014). O aumento de 10 % da dose a cada 25 dias foi utilizado para evitar adaptação dos animais à droga, elevando, porém, a mortalidade experimental de 5 % para 14,3 % (LIMA et al., 2008).

Durante o processo de indução de fibrose e cirrose, foram notadas oscilações nos pesos dos animais, sendo mais notável o retardo no ganho de peso em relação aos animais

controle. Por volta da 7ª e 8ª semana, houve uma queda brusca na massa corporal, que se manteve até por volta da 14ª semana nos animais induzidos a cirrose hepática. Após término da indução da doença, observou-se um ganho de peso rápido por volta da 2ª e 3ª semana, tanto nos animais tratados quanto não-tratados, sendo, porém, mais acentuado nos animais submetidos à terapia celular. Guerra et al. (2009) também observaram perda de peso dos animais submetidos à cirrose hepática, porém estes ganhavam peso após o período entre a 4ª e a 7ª semana de indução, ao aumentar a dose da droga em 20 %, efeito não observado neste experimento. Em outro experimento, foi observado comportamento linear no peso dos animais durante indução da cirrose hepática, até o término da indução com 14 semanas (SILVA, 2011). Uma das consequências da cirrose hepática é a perda de apetite, e a administração prolongada da TAA também provoca perda de peso, explicando as oscilações encontradas no experimento e o déficit no ganho de peso em relação aos controles (MOREIRA et al., 1995; FONTANA et al., 1996; AL-BADER et al., 2000; JEONG et al., 2001).

Entretanto, Rui et al. (2014) observaram que, após a interrupção da administração da TAA, os animais tinham um rápido ganho de peso nas duas semanas seguintes, assim como foi observado neste experimento. Porém, a terapia celular parece ter provocado um pico no ganho de peso ligeiramente mais acentuado em relação aos animais não tratados. Outros dados sobre o ganho de peso pós-terapia celular não estão descritos na literatura para este modelo.

Os indicadores bioquímicos de lesão hepática têm a função de averiguar o estado geral do fígado e sistema biliar (GOMES et al., 2008). Para suas análises, foram escolhidos 5 parâmetros para teste neste experimento: aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), albumina (ALB), proteínas totais (PT) e gama-glutamilttransferase (GGT). Esta última não apresentou resultados satisfatórios, devido ao longo período de armazenamento das amostras. A bilirrubina não foi analisada devido a sua fotossensibilidade, e a ALT não foi testada por falta de volume de amostra, tendo sido dada preferência para a AST.

As aminotransferases séricas ALT e AST são indicadores confiáveis de alterações funcionais ou estruturais das células hepáticas, e são úteis no diagnóstico de doenças hepáticas (NOGUCHI et al., 2002; OZER et al., 2008). Índices elevados de AST e ALT indicam respectivamente, a presença de fibrose e injúria hepática (GRIGORESCU, 2006); e aumento na permeabilidade da membrana com consequente morte celular (MURIEL; ESCOBAR, 2003). Neste experimento não houve diferenças estatísticas nos valores de AST após terapia celular, tanto no grupo induzido a fibrose quando no induzido a cirrose. Porém, o grupo

tratado para cirrose apresentou uma tendência a um aumento dos valores de AST, indicando que apesar do uso das células-tronco, a fibrose pode ter permanecido e se agravado. Zhang et al. (2011), por outro lado, observou notável redução nos valores de AST após infusão de células-tronco de membrana amniótica em ratos induzidos a cirrose pelo tetracloreto de carbono, através do baço, indicando que esta via de aplicação pode ser mais eficaz para a terapia da cirrose do que a apresentada aqui, ainda que seja bem mais invasiva.

Os índices aumentados de FA e GGT na cirrose hepática indicam colestase e prejuízo da função hepatobiliar (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). Neste experimento, não houve diferenças estatísticas nos valores de FA, ainda que observado que em todos os grupos houve redução dos valores após o período pós-indução, tanto dos tratados quanto não tratados. Rui et al. (2014) também observou redução dos valores de FA após 90 dias da indução de cirrose hepática pela TAA, mesmo sem a realização de nenhum tratamento. Nasir et al. (2013), porém, observou redução significativamente maior em animais que foram tratados com células-tronco mesenquimais e interleucina-6, indicando que a terapia multifatorial pode estar envolvida na melhora da função hepática, ainda que o fígado por si só seja capaz de reduzir os níveis de FA após interrupção do estímulo nocivo.

As proteínas totais (PT) e a albumina (ALB) estão relacionadas às funções de síntese e metabolismo hepático, podendo estar severamente reduzidas em quadros de cirrose hepática avançada (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008). Neste experimento, não foram observadas diferenças estatísticas nos valores de PT e ALB entre animais tratados ou não tratados, ainda que tenha sido observado aumento no valor destes parâmetros em todos os grupos, tanto tratados quanto não tratados. Rui et al. (2014) demonstraram que o fígado pode recuperar sua função mesmo sem uso de tratamento após interrupção do estímulo nocivo, havendo aumento nos valores de albumina, possivelmente devido a uma resposta compensatória da porção do órgão que permanece íntegra durante a lesão. Porém, diferenças estatísticas importantes foram observadas após terapia com células-tronco derivadas de medula óssea, observando-se aumento da albumina de 1,62 g/dL para 2,08 g/dL de acordo com CHIOZZI et al., 1997. Em outro experimento, no qual houve embolização de células-tronco de medula óssea autólogas pela veia porta, também foi observado aumento significativo dos valores de albumina em relação aos animais não tratados (LI et al., 2013)

. As análises macroscópicas foram pouco elucidativas para os animais induzidos a fibrose hepática. Após 8 semanas da aplicação da TAA, foi possível observar os fígados mais friáveis. Porém, decorridos 90 dias, não foi possível notar diferença nos fígados de animais tratados, que, assim como os não tratados, assemelharam-se muito aos controles. Já a

macroscopia dos animais induzidos a cirrose hepática, foi possível observar fígado bastante friável e de aspecto micronodular após 14 semanas de administração de TAA. E ainda, decorridos 90 dias após a indução, foi possível notar melhora do aspecto macroscópico hepático, porém para os animais não tratados o fígado ainda apresentava-se um pouco friável. Os fígados de animais submetidos à terapia celular, no entanto, assemelharam-se em muito aos de animais tratados para fibrose e aos controles sugerindo uma melhora após o tratamento.

A fibrose e a cirrose podem ser submetidas a graduação e estadiamento segundo método descrito por ISHAK et al. (1995). Na graduação, é avaliado o índice de atividade histológica e a atividade necroinflamatória tecidual do órgão, atribuindo-se um escore de 0 a 18. Já no estadiamento, observa-se a quantidade de tecido conjuntivo presente no fígado, atribuindo-se um escore de 0 a 6.

Na análise da terapia da fibrose e cirrose aqui apresentada, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Porém, a tendência mostrou, tanto na fibrose quanto na cirrose, uma discreta diminuição dos escores de graduação e estadiamento nos animais submetidos à terapia celular sugerindo uma mudança possível melhora com esta terapia. De acordo com Rui et al., pós indução da cirrose pela TAA e tentativa de regressão espontânea, não há melhora na graduação, e há piora no estadiamento (RUI et al., 2014) o que apesar de não ser significativo nossos dados sugerem uma tendência de melhora. Em dois modelos de lesão hepática através de ligadura do ducto biliar, houve melhora nestes mesmos parâmetros em animais que receberam aplicação de um fragmento de membrana amniótica sobre o tecido em relação aos que não receberam (SANT'ANNA et al., 2011; RICCI et al., 2013). Este fenômeno pode estar relacionado ao método de indução da lesão, que pode ser caracterizada como tendo caráter agudo; e pelo uso da membrana amniótica como prevenção, e não como terapia da injúria hepática.

Além do índice necroinflamatório, várias alterações celulares podem ser utilizadas para quantificar o grau de lesão hepática em animais fibróticos e cirróticos. Com o prejuízo da estrutura hepatocelular, podem ser notadas lesões nucleares (HENMI; UCHIDA; SHIKATA, 1985), com perda da matriz citoplasmática e rompimento de membranas celulares, caracterizando vacuolização e apoptose, sinais relacionados à insuficiência hepática (DAVIES et al., 1991; LAU et al., 1992; WALKER et al., 1993). As células ovas estão presentes quando há extensa perda de hepatócitos (KUBOTA et al., 2008), estando relacionadas à replicação de novas células hepáticas. Porém, sua proliferação exacerbada pode também estar relacionada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (LOWES et al., 1999; TSAMANDAS et al., 2007). Outras alterações clássicas ainda podem estar presentes na

injúria hepática, indicando dano ou proliferação tecidual, tal como as células binucleadas, figuras de mitose, inclusões eosinofílicas e megalocitose. Ainda, a deposição e hemossiderina caracteriza lesão vascular com extravasamento de hemácias para o interstício, e a esteatose pode estar presente como acúmulo de gordura intra ou extracelular, devido ao prejuízo no metabolismo hepático (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Quando o fígado cirrótico não é tratado, as alterações celulares não se modificam após 90 dias (RUI et al., 2014). Neste trabalho, as diferenças estatísticas também não foram significativas para as alterações celulares dos animais tratados em relação aos não tratados. Nos animais induzidos a fibrose, notou-se uma tendência a um aumento da megalocitose, células ovais e lesões nucleares, que podem estar relacionados à proliferação tecidual; enquanto os outros parâmetros tiveram discreta redução, dando indícios de menor lesão tecidual. Já nos animais induzidos a cirrose, a vacuolização, figuras mitóticas, lesões nucleares e corpúsculos de apoptose foram as mais elevadas, mostrando que a terapia celular não foi eficaz ao reduzir a injúria hepática a longo prazo.

A proliferação de ductos é uma resposta hiperplásica à injúria tecidual, e é observada com frequência no modelo da tioacetamida (FONTANA et al., 1996; AL-BADER et al., 2000; JEONG et al., 2001; SILVA et al., 2011), e mesmo após a remoção do estímulo, a reação proliferativa ainda pode permanecer (RUI et al., 2014). Neste trabalho, não houve diferença estatística na proliferação de ductos nos animais submetidos à terapia celular, apesar da tendência ter mostrado uma discreta redução deste parâmetro. Diferentemente de Ricci et al., 2013, que observaram uma proliferação de ductos reduzida ao aplicar membrana amniótica sobre fígados submetidos à ligadura do ducto biliar. Da mesma maneira devemos lembrar que a ligadura de ductos é um processo agudo e talvez ainda mais irreversível.

Não foram observadas, ainda, diferenças estatísticas na deposição de mucopolissacarídeos ácidos e neutros/glicogênio nos animais tratados em relação aos não tratados, tendo havido, porém, uma tendência a uma menor deposição de ambos tanto na fibrose quanto na cirrose significando uma melhora do quadro.

A deposição de glicogênio, quando aumentada, pode estar relacionada a altos níveis de ALT, visto que essa enzima catalisa a interconversão do grupamento amino da alanina para o alfa-cetoglutarato, formando piruvato, e, portanto, desempenha importante função na gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos hepáticos (SCHINDHELM et al., 2006). Já os mucopolissacarídeos ácidos estão relacionados a proliferação de ductos e ao colangiocarcinoma, sendo característicos em quadros de cirrose avançada, e bastante observados no modelo da tioacetamida (AL-BADER et al., 2000). Quando os animais são

induzidos à cirrose pelo modelo da tioacetamida sem realização de nenhum tipo de terapia, é documentado um aumento na deposição de mucopolissacarídeos ácidos e neutros mesmo após interrupção do estímulo (RUI et al., 2014), indicando que a terapia pode ter sido favorável no sentido de prevenir uma piora deste quadro. Neste trabalho, não houve diferença significativa na deposição de glicogênio e mucopolissacarídeos e ácidos, havendo porém uma tendência a sua redução após o tratamento, indicando menor atividade de ALT e redução da manifestação do colangiocarcinoma.

As células estreladas hepáticas são células nativas do fígado que, quando ativadas, aumentam a síntese de colágeno do tipo I, modificando a morfologia e vascularização hepática, e provocando fibrose e cirrose (JIANG; STEFANOVIC, 2008; BRENNER, VELOZ, JAENISCH et al., 1993). A deposição desse tipo de colágeno pode ser quantificada através da coloração pelo Picrosírius.

Para os animais induzidos a fibrose, observou-se um maior depósito de colágeno intralobular em animais tratados, que pode estar relacionado a um remodelamento da doença, visto que após a interrupção do estímulo há diminuição da permeabilidade vascular e, portanto, menor depósito de fibras. Este efeito também ocorre espontaneamente após interrupção do estímulo sem realização de terapia em animais com cirrose avançada, devido à compensação fisiológica do órgão, como observado por Rui et al (2014).

Por outro lado, os animais induzidos a cirrose hepática e terapia com células-tronco de membrana amniótica mostraram significativa diminuição dos colágenos inter e intralobular, ainda que estes valores sejam maiores que dos animais controle. Esta diminuição pode estar relacionada a produção de fatores parácrinos pelas células-tronco, tal como IL-10, TNF- α e HGF, que estão relacionados à redução da fibrose (HENDERSON; FORBES, 2008). Redução semelhante na deposição de matriz extracelular foi observada por Ricci et al. (2013), em experimento utilizando membrana amniótica criopreservada para tratamento de fibrose em ratos pelo modelo de ligadura do ducto biliar.

O PCNA é um marcador de proliferação celular, e está presente no processo de regeneração hepática (MEHTA, 1995). No processo de cirrose hepático, foi demonstrado um aumento de positividade no PCNA, associado ao intenso processo de regeneração tecidual (WANG et al., 1999; CHAN et al., 2010; GU et al., 2010). Neste experimento, não houve diferenças estatísticas nos níveis de PCNA entre animais tratados e não tratados. Porém, a tendência mostra que os níveis de PCNA estiveram elevados após a indução da fibrose e cirrose hepática, e, após a terapia celular, os animais tratados mostraram expressão ainda maior deste marcador. Estes achados podem estar relacionados com um aumento na

regeneração tecidual, relacionado ao estímulo parácrino ocasionado pela liberação de diversos fatores pelas células-tronco, levando a uma maior atividade de divisão celular. O PCNA também esteve aumentado em lesões hepáticas tratadas com células CD34+ purificadas (NAKAMURA et al., 2012), e após infusão de células-tronco de medula óssea autólogas (TERAI et al., 2006).

No processo de fibrose e cirrose hepática, as células estreladas hepáticas se proliferam e se transformam em miofibroblastos ativos, expressando α -actina de músculo liso (α -SMA) e liberando pró-colágeno I (FRIEDMAN, 1993). Estas células ativadas, por sua vez, intensificam a deposição de matriz extracelular, aumentando a liberação de colágeno dos tipos I (FRIEDMAN, 1993; GARCÍA et al., 2002; SCHAEFER et al., 2003) e tipo III (SCHUPPAN et al., 1999; BRENNER et al., 2000; FRIEDMAN, 2000). Neste trabalho, a expressão de α -SMA, colágeno I e colágeno III foram analisadas através de imunohistoquímica, não tendo sido observadas diferenças estatísticas para nenhum dos marcadores dos animais tratados em relação aos não tratados. Porém, a tendência mostra que houve expressão discretamente reduzida desses marcadores nos animais tratados, tanto para fibrose quanto para cirrose hepática. É possível que esta redução esteja relacionada a uma modulação de fatores fibrogênicos mediada pelas células-tronco, levando a uma expressão reduzida das células estreladas hepáticas e menor deposição da matriz extracelular. Hodge et al. (2014) demonstrou redução nos níveis de α -SMA após tratamento de fibrose com meio condicionado contendo fatores liberados por células-tronco de membrana amniótica. Já níveis reduzidos de colágeno foram observados por Ricci et al. (2013) após uso de membrana amniótica criopreservada em modelo de cirrose por ligadura do ducto biliar. Por fim, estudos com células-tronco de medula óssea em cirrose pelo modelo da tioacetamida também resultaram em níveis reduzidos de colágeno tipo I e α -SMA (SHAO et al., 2014).

No geral podemos dizer que o modelo experimental foi eficaz e sugere-se, que as diferenças estatísticas permanecem não significativas, ou se as discretas melhoras apresentadas nas análises podem ser relevantes em um grupo maior de animais e ainda que a realização de mais aplicações de células, e não somente uma, pode potencializar os efeitos terapêuticos das células-tronco de membrana amniótica na fibrose/cirrose.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados após a terapia celular utilizando células-tronco de membrana amniótica de rato para tratamento de fibrose e cirrose hepática em ratos *Wistar* pelo modelo da tioacetamida, foi possível concluir:

- 1) O modelo da tioacetamida foi eficaz para indução da fibrose e cirrose hepáticas durante 8 e 14 semanas de administração, respectivamente;
- 2) No geral, houve pouca melhora em relação aos animais não tratados, sendo as únicas diferenças significativas a redução da deposição de colágeno intralobular e interlobular na cirrose; e do intralobular na fibrose; entretanto vários parâmetros se mostram com tendências de melhora nos animais tratados como:
 - As enzimas hepáticas apresentaram melhora tanto nos animais tratados quanto naqueles não tratados;
 - A graduação e o estadiamento tiveram discreta melhora através da terapia celular;
 - As alterações celulares tiveram discreta melhora na lesão e aumento da regeneração tecidual;
 - A deposição de mucopolissacarídeos ácidos e neutros teve uma discreta redução;
 - A proliferação de ductos diminuiu com a terapia celular;
 - Houve tendência a um aumento do PCNA após terapia celular, e redução da expressão do colágeno 1 e 3 e de α -SMA.
- 3) As alterações acima não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Porém, houve tendências a melhora, o que nos encoraja acreditar que este protocolo possa no futuro ser utilizado em animais/humanos entretanto, novos experimentos com um número maior de animais possam ser realizados.

REFERÊNCIAS

- AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 11, p. 5872-5876, 1995.
- AL-BADER, A.; MATHEW, T. C.; ABUL, H.; AL-SAYER, H.; SINGAL, P. K.; DASHTI, H. M. Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 208, n. 1-2, p. 1-10, 2000.
- ALBANIS, E.; FRIEDMAN, S. L. Antifibrotic agents for liver disease. **American Journal of Transplantation**, v. 6, n. 1, p.12-19, 2006.
- ALCOLADO, R.; ARTHUR, M. J.; IREDALE, J. P. Pathogenesis of liver fibrosis [abstract]. **Clinical Science**, v. 92, n. 2, p. 103-112, 1997.
- ALISON, M. R.; GOLDING, M.; SARRAF, C.; EDWARDS, R. J.; LALANI, E. N. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 110, n. 4, p. 1182-1190, 1996.
- ALLER, M.; ARIAS, N.; PRIETO, I.; AGUDO, S.; GILSANZ, C.; LORENTE, L.; ARIAS, J.; ARIAS, J. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 7, p. 199-208, 2012.
- AN, W.; LIU, X. J.; LEI, T. G.; DAI, J.; DU, G. G. Growth induction of hepatic stimulator substance in hepatocytes through its regulation on EGF receptors. **Cell Research**, v. 9, n. 1, p. 37-49, 1999.
- ANDERSSON, M.; SEVELIUS, E. Breed, sex and age distribution in dogs with chronic liver disease: a demographic study. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, p. 1-5, 1991.
- ANDIRAN, F.; AYHAN, A.; TANYEL, C.; ABBASOGLU, O.; SAYEK, I. Regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following 70 % hepatectomy in rats and the effect of alfa-tocopherol on cirrhotic regeneration. **Journal of Surgical Research**, v. 89, p. 184-188, 2000.
- ANDREASEN, P. A.; KJOLLER, L.; CHRISTENSEN, L.; DUFFY, M. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. **International Journal of Cancer**, v. 72, n. 1, p. 1-22, 1997.
- ANTHONY, P. P.; ISHAK, K. G.; NAYAK, N. C.; POULSEN, H. E.; SCHEUER, P. J.; SOBIN, L. H. The morphology of cirrhosis: recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, p. 395-414, 1978.
- ARIAS, I. M.; BOYER, J. L.; FAUSTO, N.; JACOBY, W. B.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D. A. **The liver: biology and pathobiology**. 3. ed. New York: Raven, 1994. 1628 p.

ARTHUR, M. J.; MANN, D. A.; IREDALE, J. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis [abstract]. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. S33-S38, 1998.

BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: Varela, 1980, v. 1, p. 245.

BAILO, M.; SONCINI, M.; VERTUA, E.; SIGNORONI, P. V.; SANZONE, S.; LOMBARDI, G.; ARIENTI, D.; CALAMNI, F.; ZATTI, D.; PAUL, P.; ALBERTINI, A.; ZORZI, F.; CAVAGNINI, F.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. O. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. **Transplantation**, v. 78, p. 1439-1448, 2004.

BANCROFT, J. D.; GAMBLE, M. **Theory and practice of histological techniques**. 5. ed. Edinburgh; London: Churchill Livingstone, 2002. 796 p.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BARATTA, B.; RIZZOLI, R.; GALLIANI, I.; VITALE, M. Early events of liver regeneration in rats: a multiparametric analysis. **Histochemical and Cellular Biology**, v. 105, n. 1, p. 61-69, 1996.

BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.

BAUTISTA, A. P.; MESZAROS, K.; BOITA, J.; SPITER, J. J. Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 48, p. 123-128, 1990.

BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 504-515, 2003.

BENTEN, D.; KUMARAN, V.; JOSEPH, B.; SCHATTENBERG, J.; POPOV, Y.; SCHUPPAN, D.; GUPTA, S. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1072-1081, 2005.

BENYON, R. C.; IREDALE, J. P.; GODDARD, S.; WINWOOD, P. J.; ARTHUR, M. J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. **Gastroenterology** v. 110, n. 3, p. 821-831, 1996.

BERK, P. D.; POTTER, B. J.; STREMMEL, W. The sinusoidal surface on the hepatocyte: a dynamic plasma membrane specialized for high volume molecular transit. In: REUTTER, W.; POPPER, H.; ARIAS, I. M.; HEINRICH, P. C.; KEPPLER, D.; LANDMANN, L. (Ed.). **Modulation of liver cell expression**. Lancaster: MTP Press, 1987. p. 107-125.

BIAN, E.; HUANG, C.; WANG, H.; CHEN, X.; ZHANG, L.; LV, X.; LI, JUN. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 175-185, 2014.

BILIC, G.; ZEISBERGER, S. M.; MALLIK, A. S.; ZIMMERMANN, R.; ZISCH, A. H. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy [abstract]. **Cell Transplantation**, v. 17, p. 955-968, 2008.

BILZER, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver International**, v. 26, n. 10, p. 1175-1186, 2006.

BISMUTH, H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. In: BLUMGARD, L. H. (Ed.). **Surgery of the liver and biliary tract**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988, p. 1-9.

BISMUTH, H.; CHICHE, L.; CASTAING, D. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver: experience with 68 liver resections. **World Journal of Surgery**, v. 19, p. 35-41, 1995.

BLANCKAERT, N.; SCHIMID, R. Physiology and pathophysiology of bilirubin metabolism. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. (Ed). **Hepatology: a textbook of liver disease**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1982. v. 1, p. 246-272.

BONACCHI, A.; ROMAGNANI, P.; ROMANELLI, R. G.; EFSSEN, E.; ANNUNZIATO, F.; LASAGNI, L.; FRANCALANCI, M.; SERIO, M.; LAFFI, G.; PINZANI, M.; GENTILINI, P.; MARRA, F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 9945-9954, 2001.

BRAVO, R.; FRANK, R.; BLUNDELL, P. A.; MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. **Nature**, v. 326, n. 6112, p. 515-517, 1987.

BRENNER, D. A., VELOZ, L., JAENISCH, R. and ALCORN, JM. Stimulation of the collagen alpha 1 (I) endogenous gene and transgene in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. **Hepatology**, 1993, v. 17, p. 287-292.

BRUCK, R.; ASHKENAZI, M.; WEISS, S.; GOLDINER, I.; SHAPIRO, H.; AEED, H.; GENINA, O.; HELPERN, Z.; PINES, M. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. **Liver International**, v. 27, n. 3, p. 373-383, 2007.

BUCHER, H. U.; BAUMGARTNER, R.; BUCHER, N.; SEILER, M.; FAUCHERE, J. C. Artificial sweetener reduces nociceptive reaction in term newborn infants. **Early Human Development**, v. 59, n. 1, p. 59-60, 2000.

CARGNONI, A.; DI MARCELLO, M.; NASSUATO, C.; ALBERTINI, A.; PAROLINI, O.. Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. **Cell Transplantation**, v. 18, p. 1147-1159, 2009a.

CARGNONI, A.; GILBELLI, L.; TOSINI, A.; SIGNORONI, P. B.; NASSUATO, C.; ARIENTI, D.; LOMBARDI, G.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin induced lung fibrosis. **Cell Transplantation**, v. 18, p. 405-422, 2009b.

CARRIERO, M. V.; LONGANESI-CATTANI, I.; BIFULCO, K.; MAGLIO, O.; LISTA, L.; BARBIERI, A.; VOTTA, G.; MASUCCI, M. T.; ARRA, C.; FRANCO, R.; DE ROSA, M.; STOPPELLI, M. P.; PAVONE, V. Structure-based design of an urokinase-type plasminogen activator receptor-derived peptide inhibiting cell migration and lung metastasis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 9, p. 2708-2717, 2009.

CASINI, A.; CUNNINGHAM, M.; ROJKIND, M.; LIEBER, C. S. Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism [abstract]. **Hepatology**, v. 13, n. 4, p. 758-765, 1991.

CASINI, A.; PINZANI, N.; MILANI, S.; GRAPPONE, C.; GALLI, G.; JEZEQUEL, A. M.; SCHUPPAN, D.; ROTELA, C. M.; SURRENTI, C. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells [abstract]. **Gastroenterology**, v. 105, n. 1, p. 245-253, 1993.

CHAN, Y-C.; CHANG, S-C.; LIU, S-Y.; YANG, H-L.; HSEU, Y-C.; LIAO, J-W. Beneficial effects of yam on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 1, p. 161-167, 2010.

CHEN, I. S.; CHEN, Y. C.; CHOU, C. H. CHUANG, R. F.; SHEEN, L. Y.; CHIU, C. H. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 7, p. 1441-1447, 2012a.

CHEN, J. Y.; CHEN, H. L.; WU, S. H.; TSAI, T. C.; LIN, M. F.; YEN, C. C.; HSU, W. H.; CHEN, W.; CHEN, C. M. Application of high-frequency ultrasound for the detection of surgical anatomy in the rodent abdomen. **The Veterinary Journal**, v. 191, p. 246-252, 2012b.

CHILAKAPATI, J.; SHANKAR, K.; KORRAPATI, M. C.; HILL, R. A.; MEHENDALE, H. M. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 12, p. 1877-1885, 2005.

CHIOZZI, P.; SANZ, J. M.; FERRADI, D.; FALZONI, S.; ALEOTTI, A.; BUELL, G. N. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor. **Journal of Cell Biology**, v. 138, p. 697-706, 1997.

CHUNG, L.; DINAKARPANDIAN, D.; YOSHIDA, N.; LAUER-FIELDS, J. L.; FIELDS, G. B.; VISSE, R.; NAGASE, H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 15, p. 3020-3030, 2004.

COLUMBANO, A.; LEDDA-COLUMBANO, G. M.; CONI, P. P.; FAA, G.; LIGUORI, C.; SANTA CRUZ, G.; PANI, P. Occurrence of cell death (apoptosis) during the involution of liver hyperplasia [abstract]. **Laboratory Investigation**, v. 52, n. 6, p. 670-675, 1985.

CONN, H. O.; ATTERBURY, C. E. Cirrhosis. In: SCHIFF, L.; SCHIFF, E. (Ed.). **Diseases of the liver**. Philadelphia: JB Lippincott, 1987. v. 20, p. 825-864.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 371.

DALAKAS, E.; NEWSOME, P. N.; HART, M.; O'NEIL, K.; LEE, P.; PAYNE, C. The cytokines, MMP-9 and SDF-1 play a central role in regulating the mobilization of CD34 stem cells in human liver injury [abstract]. **Hepatology**, v. 40, p. 622A, 2004.

DANO, K.; ANDREASEN, P. A.; GRONDAHL-HANSEN, J.; KRISTENSEN, P.; NIELSEN, L. S.; SKRIVER, L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer [abstract]. **Advances in Cancer Research**, v. 44, p. 139-266, 1985.

DAVID, P.; ALEXANDRE, E.; CHENARD-NEU, M.; WOLF, P.; JAECH, D.; RICHERT, L. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase albuminaemic rats. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 2, p. 158-164, 2002.

DAVIES, S. E.; PORTMANN, B. C.; O'GRADY, J. G.; ALDIS, P. M.; CHAGGAR, K.; ALEXANDER, G. J.; WILLIAMS, R. Hepatic histological findings after transplantation for chronic hepatitis B virus infection, including a unique pattern of fibrosing cholestatic hepatitis. **Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 150-157, 1991.

DAYOUB, R.; THASLER, W. E.; BOSSERHO, A. K.; SINGER, T.; JAUCH, K-W.; SCHLITT, H. J.; WEISS, T. S. Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augments liver regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 181-187, 2006.

DEKEL, R.; ZVIBEL, I.; BRILL, S.; BRAZOVCKI, E.; HALPERN, Z.; OREN, R. Gliotoxin ameliorates development of fibrosis and cirrhosis in a thioacetamide rat model. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 48, n. 8, p. 1642-1647, 2003.

DENNLER, S.; GOUMANS, M. J.; TEN DIJKE, P. Transforming growth factor beta signal transduction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 5, p. 731-740, 2002.

DESMET, V. J. Morphology and development of the hepatobiliary system. In: BOCK, K. W. MATERN, S.; GEROK, W. SCHIMID, R. (Ed.). **Hepatic metabolism and disposition of endo- and xenobiotics**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 3-17.

DESMET, V. J.; ROSKAMS, T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. **Journal of Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 860-867, 2004.

DI SARIO, A.; BENDIA, E.; MACARRI, G.; CANDELARESI, C.; TAFFETANI, S.; MARZIONI, M.; OMENETTI, A.; DE MINCIS, S.; TROZZI, L.; BENEDETTI, A. The anti-fibrotic effect of pirfenidone in rat liver fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I), TIMP-1 and MMP-2 [abstract]. **Digestive and Liver Disease**, v. 36, n. 11, p. 744-751, 2004.

DIAZ-GIL, J. J.; MUNOZ, J.; ALBILLOS, A.; RÚA, C.; MACHIN, C.; GARCIA-CAÑERO, R.; CARECEDA, R. M.; GUIJARRO, M. C.; TRILLA, C.; ESCARTIN, P. Improvement in liver fibrosis, functionality and hemodynamics in CCl₄-cirrhotic rats after injection of Liver Growth Factor. **Journal of Hepatology**, v. 30, p. 1065-1072, 1999.

DILL-MACKY, E. Chronic hepatitis in dogs. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n.2, p. 387-398, 1995.

DIXON, L. J.; BARNES, M.; TANG, H.; PRITCHARD, M. T.; NAGY, L. E. Kupffer cells in the liver. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 785-797, 2013.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOYLE, M.; WILSON, R. B.; HARTROFT, W. S. The effect of starvation on liver regeneration in rats after partial hepatectomy [abstract]. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 9, p. 400-404, 1968.

DUNCAN, A.; DORRELL, C.; GROMPE, M. Stem Cells and Liver Regeneration. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 466-481, 2009.

EPSTEIN, M. Hepatorenal syndrome. **Revista Clínica Española**, v. 183, n. 1, p. 37-41, 1988.

FARBER, E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. **Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 142-148, 1956.

FAUSTO, N.; MEAD, J. E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. **Laboratory Investigation**, v. 60, n. 1, p. 4-13, 1989.

FAUSTO, N.; LAIRD, A. D.; WEBBER, E. M. Liver regeneration 2: role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1527-1536, 1995.

FAUSTO, N. Liver regeneration. **Journal of Hepatology**, v. 32, p. 19-31, 2000. Supplement 1.

FELDMANN, G. The cytoskeleton of the hepatocytes. Structure and functions [abstract]. **Journal of Hepatology**, v. 8, p. 313-323, 1989.

FERREL, L. Liver pathology: cirrhosis, hepatitis, and primary liver tumors. Update and diagnostic problems. **Modern Pathology**, v. 13, p. 674-704, 2000.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells [abstract]. **Cell Tissue Kinetics**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FLOHR, T. R.; BONATTI, H. J.; BRAYMAN, K. L.; PRUETT, T. L. The use of stem cells in liver disease. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 14, p. 64-71, 2009.

FONTANA, L.; MOREIRA, E.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, M. I.; RÍOS, A.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GIL, A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**, v. 106, n. 1-3, p. 197-206, 1996.

FRIEDMAN, S. L. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, 1993.

FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2247-2250, 2000.

FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis from bench to bedside. **Journal of Hepatology**, v. 38, n. 1, p. 38-53, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 1, p. 98-105, 2004.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis - overview. **Toxicology**, v. 254, n. 3, p. 120-129, 2008.

FRIEDMAN, S. L.; SCHIANO, T. Cirrhosis and its sequelae. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil textbook of medicine**, 22. ed. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 936-944.

FRIEDMAN, S. L.; WEI, S.; BLANER, W. S. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF [abstract]. **The American Journal of Physiology**, v. 264, n. 5, pt. 1, p. G947-G952, 1993.

FUENTEALBA, C.; GUEST, S.; HAYWOOD, S.; HORNEY, B. Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 365-373, 1997.

GARCÍA, L.; HERNÁNDEZ, I.; SANDOVAL, A.; SALAZAR, A.; GARCIA, J.; VERA, J.; GRIJALVA, G.; MURIEL, P.; MARGOLIN, S.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 6, p. 797-805, 2002.

GEORGE, J.; WANG, S. S.; SEVCSIK, A. M.; SANICOLA, M.; CATE, R. L.; KOTELIANSKY, V. E.; BISSELL, D. M. Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform [abstract]. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 1, p. 115-124, 2000.

GEORGE, J.; RAO, K. R.; STERN, R.; CHANDRAKASAN, G. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. **Toxicology**, v. 156, n. 2-3, p. 129-138, 2001.

GERACI, J. R.; MEDWAY, W. Simulated Field blood studies in the bottle-nosed dolphin *Tursiops truncatus*: effects of stress on some hematologic and plasma chemical parameters [abstract]. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 9, n. 1, pt. 2, p. 29-33, 1973.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GILCHRIST, E. S.; PLEVRIS, J. N. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. **Liver Transplantation**, v. 16, n. 2, p. 118-129, 2010.

GNAINSKY, Y.; SPIRA, G.; PAIZI, M.; BRUCK, R.; NAGLER, A.; ABU-AMARA, S.; GEIGER, B.; GENINA, O.; MONSONEGO-ORNAN, E.; PINES, M. Halofuginone, an inhibitor of collagen synthesis by rat stellate cells, simulates insulin-like growth factor

binding protein-1 synthesis by hepatocytes. **Journal of Hepatology**, v. 40, n. 2, p. 269-277, 2004.

GOMES, A.; PARRA, B. S.; FRANCO, F. O.; BASILE, L.; JOSÉ, L. T.; ROMERO, V. L. Exame da função hepática na medicina veterinária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1-7. 2008.

GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions [abstract]. **European Journal of Cell Biology**, v. 74, n. 2, p. 111-122, 1997.

GORDON, M. Y.; LEVICAR, N.; PAI, M.; BACHELLIER, P.; DIMARAKIS, I.; AL ALLAF, F. Characterization and clinical application of human CD34 stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. **Stem Cells**, v. 24, p. 1822-1830, 2006.

GRIGORESCU, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. **Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases**, v. 15, n. 2, p. 149-159, 2006.

GRISHAM, J. W. Cell types in long-term propagable cultures of rat liver [abstract]. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 349, p. 128-137, 1980.

GROZSMANN, R. K.; ATTERBURY, C. E. The pathophysiology of portal hypertension: a basis for classification [abstract]. **Seminars in Liver Disease**, v. 2, n. 3, p. 177-186, 1982.

GU, K.; ZHAO, J.-D.; REN, Z.-G.; MA, N.-Y.; LAI, S.-T.; WANG, J.; LIU, J.; JIANG, G.-L. A natural process of cirrhosis resolution and deceleration of liver regeneration after thioacetamide withdrawal in a rat model. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1687-1696, 2011.

GUERRA, R. R.; TROTTA, M. R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUES, F. J. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 1027-1034, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 973.

HAGA, S.; TERUI, K.; ZHANG, H. Q.; ENOSAWA, S.; OGAWA, W.; INOUE, H.; OKUYAMA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; OGINO, T.; IRANI, K.; OZAKI, M. STA3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 989-998, 2003.

HAJOVSKY, L.; HU, G.; KOEN, Y.; SARMA, D.; CUI, W.; MOORE, D. S.; STAUDINGER, J.; HANZLIK, R. P. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in rat hepatocytes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 9, p. 1955-1963, 2012.

HARKNESS, R. D. The spatial distribution of dividing cells in the liver of the rat after partial hepatectomy. **The Journal of Physiology**, v. 116, n. 4, p. 373-379, 1952.

HARUYAMA, T.; AJIOKA, I.; AKAIKE, T.; WATANABE, Y. Regulation and significance of hepatocyte-derived matrix metalloproteinases in liver remodeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, n. 3, p. 681-686, 2000.

HASHIMI, A. Z.; HAKIM, W.; KRUGLOV, E. A.; WATANABE, A.; WATKINS, W.; DRANOFF, J. A.; MEHAL, W. Z. Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 1, p. G395-G401, 2007.

HASHIMOTO, M.; KOTHARY, P. C.; ECKHAUSER, F. E.; RAPER, S. E. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. 1259-1265, 1998.

HATAKEYAMA, Y.; ONO, T.; SATO, N.; SAKUMA, H.; KOYAMA, Y.; INOUE, N.; TAKENOSHITA, S.; OMATA, S. Usefulness of the tactile sensor for estimating the degree of liver fibrosis and the DNA synthesis activity of remnant liver cells after partial hepatectomy. **Fukushima Journal of Medical Science**, v. 48, n. 2, p. 93-101, 2002.

HEIDELBAUGH, J. J.; BRUDERLY, M. Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. **American Family Physician**, v. 74, n. 5, p. 756-762, 2006.

HENDERSON, N. C.; FORBES, S. J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. **Toxicology**, v. 254, p. 130-135, 2008.

HENMI, A.; UCHIDA, T.; SHIKATA, T. Karyometric analysis of liver cell dysplasia and hepatocellular carcinoma; evidence against precancerous nature of liver cell dysplasia. **Cancer**, v. 55, n. 11, p. 2594-2599, 1985.

HIB, J. **Di Fiore histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 513.

HODGE, A.; LOURENSZ, D.; VAGHJANI, V.; NGUYEN, H.; TCHONGUE, J.; WANG, B.; MURTHI, P.; SIEVERT, W.; MANUELPIILLAI, U. Soluble factors derived from human amniotic epithelial cells suppress collagen production in human hepatic stellate cells. **Cytotherapy**, v. 16, n. 8, p. 1132-1144, 2014. In press.

HOUS SAINT, E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. **Cell Differentiation**, v. 9, n. 5, p. 269-279, 1980.

HWANG, S.; HONG, H. N.; KIM, H. S.; PARK, S. R.; WON, Y. J.; CHOI, S. T.; CHOI, D. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Cell Biology International**, v. 36, n. 3, p. 279-88, 2011.

IIMURO, Y.; NISHIO, T.; MORIMOTO, T.; NITTA, T.; STEFANOVIC, B.; CHOI, S. K.; BRENNER, D. A.; YAMAOKA, Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 445-458, 2003.

- IKEDA, K.; WAKAHARA, T.; WANG, Y. Q.; KADOYA, H.; KAWADA, N.; KANEDA, K. In vitro migratory potential of rat quiescent hepatic stellate cells and its augmentation by cell activation. **Hepatology**, v. 29, n. 6, p. 1760-1767, 1999.
- INAGAKI, Y.; NEMOTO, T.; KUSHIDA, M.; SHENG, Y.; HIGASHI, K.; IKEDA, K.; KAWADA, N.; SHIRASAKI, F.; TAKEHARA, K.; SUGIYAMA, K.; FUJII, M.; YAMAUCHI, H.; NAKAO, A.; DE CROMBRUGGHE, B.; WATANABE, T.; OKAZAKI, I. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 890-899, 2003.
- INAGAKI, Y.; OKAZAKI, I. Emerging insights into transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. **Gut**, v. 56, n. 2, p. 284-292, 2007.
- ISHAK, K.; BAPTISTA, A.; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N. M.; PHILLIPS, M. J.; PORTMANN, B. G.; POULSEN, H.; SCHEUER, P. J.; SCHMID, M.; THALER, H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of Hepatology**, v. 22, n. 6, p. 696-699, 1995.
- JIANG, F.; STEFANOVIC, B. Homeobox gene Prx1 is expressed in activated hepatic stellate cells and transactivates collagen $\alpha 1(I)$ promoter. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 286-296, 2008.
- JEONG, D.; JANG, J.; LEE, S.; LEE J.; LIM, I.; LEE, M.; LEE, Y. Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCL₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**, v. 36, n. 1, p. 24-32, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 488 p.
- KANG, J. S.; KANG, H.; PARK, Y.; LEE, Y.; PARK, K.; LEE, Y.; KIM, S.; RYU, D. Expression of epithelial cell adhesion molecule and proliferating cell nuclear antigen in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, p. 138-142, 2013.
- KANNO, K.; TAZUMA, S.; CHAYAMA, K. AT1-A- deficient mice show less severe progression of liver fibrosis induced by CCL₄. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 177-183, 2003.
- KAPLOWITZ, N.; EBERLE, D.; YAMADA, T. Biochemical tests for liver disease. In: ZAKIM, D.; BOYER, T. D. (Ed.). **Hepatology: a textbook of liver disease**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1982. v. 1, p. 583-607.
- KARIN, M.; BEM-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa] B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621-663, 2000.
- KATO, A.; BAMBA, H.; SHINOHARA, M.; YAMAUCHI, A.; OTA, S.; KAWAMOTO, C.; YOSHIDA, Y. Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 20, n. 8, p. 1198-1205, 2005.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, n. 6, p. 629-640, 1997.

KHAN, A. A.; PARVEEN, N.; MAHABOOB, V. S.; RAJENDRAPRASAD, A.; RAVINDRAPRAKASH, H. R.; VENKATESWARLU, J. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. **Transplant Procedures**, v. 40, p. 1140-1144, 2008.

KHANNA, S. D.; PURI, D. The hepatotoxic effects of dimethylnitrosamine in the rat [abstract]. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 1, p. 605-608, 1966.

KNITTEL, T.; JANNECK, T.; MULLER, L.; FELLMER, P.; RAMADORI, G. Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 352-360, 1999a.

KNITTEL, T.; MEHDE, M.; KOBOLD, D.; SAILE, B.; DINTER, C.; RAMADORI, G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. **Journal of Hepatology**, v. 30, n. 1, p. 48-60, 1999b.

KNODELL, R. G.; ISHAK, K. G.; BLACK, W. C.; CHEN, T. S.; CRAIG, R.; KAPLOWITZ, N.; KIERNAN, T. W.; WOLLMAN, J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. **Hepatology**, v. 1, p. 431-435, 1981.

KOGURE, K.; ISHIZAKI, M.; NEMOTO, M.; KUWANO, H.; MAKUUCHI, M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. **Journal of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery**, v. 6, p. 171-175, 1999.

KONTOURAS, J.; BILLING, B. H.; SCHEUER, P. J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **Brazilian Journal of Experimental Pathology**, v. 65, p. 305-311, 1984.

KOOY, D.; WEISS, S. Why stem cells? **Science**, v. 287, p. 1439-1441, 2000.

KRUSE, F. E.; CURSIEFEN, C. C. Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation [abstract]. **Developments in Ophthalmology**, v. 41, p. 159-170, 2008.

KUBOTA, K.; SOEDA, J.; MISAWA, R.; MIHARA, M.; MIWA, S.; ISE, H.; TAKAHASHI, M.; MIYAGAWA, S. Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 448-454, 2008.

KUMAR, M.; SARIN, S. K. Is cirrhosis of the liver reversible? **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, n. 4, p. 393-399, 2007.

LAI, J.; CHEN, Z. E.; LOK, T.; CHAN, O. T. M.; HIMMELFARB, E.; ZHAI, Q.; LIN, F.; WANG, H. L. Immunohistochemical stains of proliferating cell nuclear antigen, insulin-like growth factor 2 and clusterin help distinguish malignant from benign nodular lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 67, p. 464-469, 2014.

LALEMAN, W.; VANDER ELST, I.; ZEEGERS, M.; SERVAES, R.; LIBBRECHT, L.; ROSKAMS, T.; FEVERY, J.; NEVENS, F. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, p. 242-249, 2006.

LAU, J. Y.; BAIN, V. G.; DAVIES, S. E.; O'GRADY, J. G.; ALBERTI, A.; ALEXANDER, G. J.; WILLIAMS, R. High-level expression of hepatitis B viral antigens in fibrosing cholestatic hepatitis. **Gastroenterology**, v. 102, n.3, p. 956-962, 1992.

LE COUTEUR, D. G.; WARREN, A.; COGGER, V. C.; SMEDSRØD, B.; SØRENSEN, K. K.; DE CABO, R.; FRASER, R.; MCCUSKEY, R. S. Old age and the hepatic sinusoid. **Anatomical Record**, v. 291, n. 6, p. 672-683, 2008.

LEE, F. Y.; GROSZMANN, R. J. Experimental models in the investigation of portal hypertension. **Ascites, Renal Dysfunction and Liver Dysfunction: Pathology, Diagnostic and Treatment**, v. 1, p. 365-378, 1999.

LEE, H. S.; MIAU, L. H.; CHEN, C. H.; CHIOU, L. L.; HUANG, G. T.; YANG, P. M.; SHEU, J. C. Differential role of p38 in IL-1 α induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line [abstract]. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, n. 6, pt. 2, p. 757-765, 2003.

LEMIRE, J. M.; SHIOJIRI, N.; FAUSTO, N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. **American Journal of Pathology**, v. 139, p. 535-552, 1991.

LESSA, I. Liver cirrhosis in Brazil: mortality and productive years of life lost prematurely. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 121, n.2, p. 111-122, 1996.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 137-161, 1998.

LI, X.; BENJAMIN, I. S.; ALEXANDER, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. **Journal of Hepatology**, v. 36, n. 4, p. 488-493, 2002.

LI, H.; HOU, S.; WANG, W.; YANG, L.; LI, Y.; TAN, J. In vitro effects of metal ions on lipid peroxidation induced by alcohol in mice liver homogenate [abstract]. **Journal of Environmental Biology**, v. 24, n. 4, p. 423-428, 2003.

LI, T.; ZHU, J.; MA, K.; LIU, N.; FENG, K.; LI, X.; WANG, S.; BIE, P. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes liver regeneration after portal vein embolization in cirrhotic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 184, n. 2, p. 1161-1173, 2013.

LIMA, T. T. **Cirrose hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar**. 2008. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LOWES, K. N.; BRENNAN, B. A.; YEOH, G. C.; OLYNYK, J. K. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. **American Journal of Pathology**, v. 154, n.2, p. 537-541, 1999.

MACLACHLAN, N. J.; CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pancreas In: CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 95-96.

MACPHEE, P. J.; SCHIMIDT, E. E.; GROOM, A. C. Evidence of Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy [abstract]. **American Journal of Physiology**, v. 236, p. G17-G23, 1992.

MAGA, G.; HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, v. 116, pt. 15, p. 3051-3060, 2003.

MANGNALL, D.; SMITH, K.; BIRD, N. C.; MAJEED, A. W. Early increases in plasminogen activator activity following partial hepatectomy in humans. **Comparative Hepatology**, v. 3, n. 1, p. 11, 2004.

MANUELPIILLAI, U.; TCHONGUE, J.; LOURENSZ, D.; VAGJIANI, V.; SAMUEL, C. S.; LIU, A. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCI₄-treated mice. **Cell Transplantation**, v. 19, p. 1157 - 1168, 2010.

MANUELPIILLAI, A.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C. V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? **Placenta**, v. 32, S320eS325, 2011.

MAO, S. A.; GLORIOSO, J. M.; NYBERG, S. L. Liver Regeneration. **Translational Research**, v. 163, n. 4, p. 352 - 362, 2014.

MARCEAU, N.; GERMAIN, L.; GOYETTE, R.; NOEL, N.; GOURDEAU, H. Cell of origin of distinct cultured rat liver epithelial cells, as typed by cytokeratin and surface component selective expression [abstract]. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 64, n. 8, p. 788-802, 1988.

MARCEAU, N.; BLOUIN, M. J.; GERMAIN, L.; NOEL, M. Role of different epithelial cell types in liver ontogenesis, regeneration and neoplasia. **In Vitro Cellular & Development Biology**, v. 25, p. 336-341, 1989.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B.. Isolation, characterization and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, v. 76, p. 130-144, 2008.

MARRA, F.; DEFRANCO, R.; GRAPPONE, C.; MILANI, S.; PINZANI, M.; PELLEGRINI, G.; LAFFI, G.; GENTILINI, P. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. **Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 462-471, 1998.

MARRA, F.; ROMANELLI, R. G.; GIANNINI, C.; FAILLI, P.; PASTACALDI, S.; ARRIGHI, M. C.; PINZANI, M.; LAFFI, G.; MONTALTO, P.; GENTILINI, P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 29, n. 1, p. 140-148, 1999.

MARTELLI-JUNIOR, H.; COTRIM, P.; GRANER, E.; SAUK, J. J.; COLETTA, R. D. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6 and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. **The Journal of Periodontology**, v. 74, n. 3, p. 296-306, 2003.

MARTI, H. P.; MCNEIL, L.; DAVIES, M.; MARTIN, J.; LOVETT, D. H. Homology cloning of rat 72 kDa type IV collagenase: cytokine and second-messenger inductibility in glomerular mesangial cells. **The Biochemical Journal**, v. 291, pt. 2, p. 441-446, 1993.

MASUMI, S.; MORIYAMA, M.; KANNAN, Y.; OHTA, M.; KOSHITANI, O.; SAWAMOTO, O.; SUGANO, T. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused liver during the development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. **Toxicology**, v. 135, n. 1, p. 21-31, 1999.

MEDWAY, W.; PRIER, J. E.; WILKINSON, J. **Patologia clínica veterinaria**. México: Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana, 1969, p. 532.

MEHTA, R. The potential for use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 93, n. 1, p. 85-102, 1995.

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 60-65, 1997.

MIKI, T.; GRUBBS, B. Therapeutic potential of placenta-derived stem cells for liver diseases: Current status and perspectives. **The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 2, p. 360-368, 2014.

MIKI, T.; STROM, S. C. Amnion-derived pluripotent/multi-potent stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 2, p. 133-142, 2006.

MILTERSTEINER, A.; MILSTERSTAINER, D.; PEREIRE-FILHO, N.; FROTA, A. R.; ELY, P. B.; ZETTLER, C. G.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. P. Uso da quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 232-237, 2003.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M. J.; TAN, E. M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells [abstract]. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 6, p. 2228-2234, 1978.

MIZOBUCHI, Y.; SHIMIZU, I.; HORI, H.; SHONO, M.; ITO, S. Retinyl palmitate reduces hepatic fibrosis in rats induced by dimethylnitrosamine or pig serum. **Journal of Hepatology**, v. 29, p. 933-943, 1998.

MIZUTANI, T.; PING, L. X.; KWAZOE, S.; HOJO, Y. Induction of hepatic DT-diaphorase in mice by butylated hydroxyanisole analogs: a structure-activity study [abstract]. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 110, p. 161-168, 2001.

MOHAMADNEJAD, M.; NAMIRI, M.; BAGHERI, M.; HASHEMI, S. M.; GHANAATI, H.; ZARE, M. N. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell

transplantation in patients with decompensated cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 3359-3363, 2007.

MOREIRA, E.; FONTANA, L.; TORRES, M. I.; FERNÁNDEZ, I.; RÍOS, A.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; GIL, A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. **JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 19, n.6, p. 461-469, 1995.

MORIS, G. F.; MATHEWS, M. B. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 23, p. 1356-1364, 1989.

MOODLEY, Y.; ILANCHERAN, S.; ATIENZA, D.; SAMUELS, C.; WALLAVE, E. M.; JENKIN, G. Human amnion epithelial stem cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, p. 643-651, 2010.

MULLER, P.; POMORSKI, T.; PORWOLI, S.; TAUBER, R.; HERMANN, A. Transverse movement of spin-labeled phospholipids in the plasma membrane of a hepatocytic cell line (HepG2): implications for biliary lipid secretion. **Hepatology**, v. 24, p. 497-503, 1996.

MUN, K.; CHEAH, P.; BAHARUDIN, N. B.; LOOI, L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) activity in hepatocellular carcinoma, benign peri-neoplastic and normal liver. **Malaysian Journal of Pathology**, v. 28, n. 2, p. 73-77, 2006.

MUÑOZ TORRES, E.; PAZ BOUZA, J. I.; LÓPEZ BRAVO, A.; ABAD HERNÁNDEZ, M. M.; CARRASCAL MARINO, E. Experimental thioacetamide-induced cirrhosis of the liver [abstract]. **Histology and Histopathology**, v. 6, n. 1, p. 95-100, 1991.

MURACA, M.; FERRARESSO, C.; VILEI, M. T.; GRANATO, A.; QUARTA, M.; COZZI, E. Liver repopulation with bone marrow derived cells improves the metabolic disorder in the Gunn rat. **Gut**, v. 56, p. 1725-1735, 2007.

MURIEL, P.; ESCOBAR, Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. **Journal of Applied Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 103-108, 2003.

MURPHY, G.; SEGAIN, J. P.; O'SHEA, M.; COCKETT, M.; IOANNOU, C.; LEFEBVRE, O.; CHAMBON, P.; BASSET, P. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 21, p. 15435-15441, 1993.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 290-308, 2008.

NAKAMURA, T.; SAKATA, R.; UENO, T.; SATA, M.; UENO, H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 247-255, 2000.

NAKAMURA, T.; TSUTSUMI, V.; TORIMURA, T.; NAITOU, M.; IWAMOTO, H.; MASUDA, H.; HASHIMOTO, O.; KOGA, H.; ABE, M.; LI, M.; KAWAMOTO, A.;

AASHARA, T.; UENO, T.; SATA, M. Human peripheral blood CD34-positive cells enhance therapeutic regeneration of chronically injured liver in nude rats. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n.4, p. 1538-1552, 2012.

NISHIKAWA, Y.; WANG, M.; CARR, B. I. Changes in TGF-beta receptor of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: Increased expression of TGF- beta receptors associated with increased sensitivity to TGFbeta mediated growth inhibition. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, n. 3, p. 61-623, 1998.

NOGUCHI, T.; IMAI T.; MIZUMOTO, R. Preoperative estimation of surgical risk of hepatectomy in cirrhotic patients [abstract]. **Hepato-gastroenterology**, v. 37, p. 165-171, 1990.

NOGUCHI, A.; REIS, J. M. C.; DIAS, C. S.; EPAMINONDAS, W. A.; AZEVEDO, P. S. R.; BRITO, M. V. H. Serum levels of aminotransferases, bilirubins and gamma-glutamyltranspeptidase after copaiba oil administration in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 130-134, 2002.

NOVO, E.; MARRA, F.; ZAMARA, E.; VALFRE DI BONZO, L.; CALIGIURI, A.; CANNITO, S.; ANTONACI, C.; COLOMBATTO, S.; PINZANI, M.; PAROLA, M. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. **Gut**, v. 55, n. 1, p. 90-97, 2006.

NZEAKO, U. C.; GOODMAN, Z.; ISHAK, K. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic livers. A clinico-histopathologic study of 804 North American patients. **American Journal Clinical Pathology**, v. 105, p. 65-75, 1996.

OE, S.; FUKUNAKA, Y.; HIROSE, T.; YAMAOKA, Y.; TABATA, Y. A trial on regeneration therapy of rat liver cirrhosis by controlled release of hepatocyte growth factor. **Journal of Controlled Release**, v. 88, n. 2, p. 193-200, 2003.

OZDOGAN, M.; ERSOY, E.; DUNDAR, K.; ALBAYRAK, L.; DEVAY, S.; GUNDOGDU, H. Beneficial effect of hyperbaric oxygenation on liver regeneration in cirrhosis. **Journal of Surgical Research**, v. 129, p. 260-264, 2005.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194-205, 2008.

PAI, M.; ZACHAROULIS, D.; MILICEVIC, M. N.; HELMY, S.; JIAO, L. R.; LEVICAR, N. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34 cells into patients with alcoholic liver cirrhosis [abstract]. **American Journal of Gastroenterology**, v. 103, p. 1952-1958, 2008.

PAKU, S.; SCHNUR, J.; NAGY, P.; THORGEIRSSON, S. S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver [abstract]. **The American Journal of Pathology**, v. 158, n. 4, p. 1313-1323, 2001.

PARADOWSKA, E.; BLACH-OLSZEWSKA, Z.; GEJDEL, E. Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term [abstract]. **Placenta**, v. 18, p. 441-446, 1997.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILICI, G.; BUHRING, H. J.; EVANGELISTA, M. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PAROLINI, O.; SONCINI, M.; EVANGELISTA, N.; SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 2, p. 275-291, 2009.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BERGWERF, I.; BORASCHI, D.; DE BARI, C.; DE WAELE, P. Toward cell therapy using placenta-derived cells: disease mechanisms, cell biology, preclinical studies, and regulatory aspects at the round table. **Stem Cells Development**, v. 19, p. 1454, 2010.

PARRA, O. M. **Métodos de estímulo da regeneração do fígado e perspectivas no tratamento da cirrose hepática: revisão, comentários e contribuição**. 1982. 219 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; FERRAZ NETO, J. B. E.; SOUZA E SILVA, R. A. P. S.; DAL COLLETO, G. M. D.; SAAD JÚNIOR, W. Additional growth of an intact liver induced by exogenous hepatotrophic factors: a study in rats. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 7, n. 64, 1992.

PARRA, O. M.; SAAD, W. A.; SOUSA, E.; SILVA, R. A. P.; HERNANDEZ BLASQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; FERRAZ-NETO, B. H.; SAAD, J. R. W. A. Stimulation of intact rat liver by exogenous hepatotrophic factors with additional growth of it's mass. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 7-11, 1994.

PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; SAAD JÚNIOR, W. A. Reduction of liver mass due to malnutrition in rats: correlation with emancipation of animals and size of organs not inserted in the portal system. **Revista Paulista de Medicina**, v. 113, n. 3, p. 903-909, 1995a.

PARRA, O. M.; SILVA, R. A. P. S.; SILVA, J. R. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PEDUTO, L.; SAAD, W. A.; JUNIOR, W. A. S. Enhancement of liver size by stimulation of intact rat liver with exogenous hepatotrophic factors. **São Paulo Medical Journal**, v. 113, n. 4, p. 941-947, 1995b.

PATTERSON, M. L.; ATKINSON, S. J.; KNÄUPER, V.; MURPHY, G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. **FEBS Letters**, v. 503, n. 2-3, p. 158-162, 2001.

PAWA, S.; ALI, S. Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1688, n. 3, p. 210-222, 2004.

PEREIRA, H. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PARRA, O. M.; COGLIATI, B.; COSTA, W. P. Quantificação do tecido colágeno em fígado com fibrose induzida em ratas

(*Rattus norvegicus albinus*) tratadas com fatores hepatotróficos exógenos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 6, p. 196-217, 2003.

PETERSEN, B. E.; ZAJAC, V. F.; MICHALOPOULOS, G. K. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. **Hepatology**, v. 27, n. 4, p. 1030-1038, 1998.

PINES, M.; KNOPOV, V.; GENINA, O.; LAVELIN, I.; NAGLER, A. Halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, prevents dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 391-398, 1997.

PINZANI, M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells [abstract]. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 7, d1720-d1726, 2002.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, p. 664-673, 2006.

PRELICH, G.; TAN, C. K.; KOSTURA, M.; MATHEWS, M. B.; SO, A. G.; DOWNEY, K. M.; STILLMAN, B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. **Nature**, v. 326, n. 6112, p. 517-520, 1987.

QUAX, P. H.; VAN DEN HOOGEN, C. M.; VERHEIJEN, J. H.; PADRO, T.; ZEHEB, R.; GELEHRTER, T. D.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J.; EMEIS, J. J. Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 26, p. 15560-15563, 1990.

RABES, H. M.; WIRSCHING, R.; TUCZEK, H. V.; ISELER, G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy [abstract]. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 9, n. 6, p. 517-532, 1976.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; CASTRO E SILVA JÚNIOR, O.; ZUCOLOTO, S.; CORRÊA, F. M. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by lisinopril enhances liver regeneration in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 125-127, 2001.

RAO, J. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nature Reviews: Cancer**, v. 3, p. 489-501, 2003.

RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, Z. J.; LOUGHEED, W. M.; LOTTO, W. N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology [abstract]. **Anatomical Record**, v. 119, p. 11-34, 1954.

RICCI, E.; VANOSI, G.; LINDENMAIR, A.; HENNERBICHLER, S.; PETERBAUER-SCHERB, A.; WOLBANK, S.; CARGNONI, A.; SIGNORONI, P. B.; CAMPAGNOL, M.; GABRIEL, C.; REDL, H.; PAROLINI, O. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. **Cell Tissue Banking**, v. 14, n.3, p. 475-488, 2013.

RIEDER, H.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H.; RAMADORI, G. Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. Filtration, endocytosis, synthetic capacities and intracellular communication [abstract]. **Journal of Hepatology**, v. 15, p. 237-250, 1992.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p. 605.

ROBERTS, M. S.; ANGUS, D. C.; BRYCE, C. L.; VALENTA, Z.; WEISSFELD, L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. **Liver Transplantation**, v. 10, n. 7, p. 886-897, 2004.

ROEB, E.; GRAEVE, L.; HOFFMANN, R.; DECKER, K.; EDWARDS, D. R.; HEINRICH, P. C. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures [abstract]. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1437-1442, 1993.

ROCKEY, D. C. Vascular mediators in the injured liver. **Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 4-12, 2003.

ROJKIND, M.; PONCE-NOYOLA, P. The extracellular matrix of the liver. **Collagen and Related Research**, v. 2, n. 2, p. 151-175, 1982.

ROULLAND-DUSSOIX D, HENRY A, LEMERCIER B. Detection of mycoplasmas in cell culture by PCR: one year study. **Elsevier Journal**, v. 19, n. 2, p.127-134, 1994.

ROTHUIZEN, J. Canine chronic liver disease: where are we now? Four pointers for future research. **The Veterinary Journal**, v. 167, n. 3, p. 219, 2004.

ROUILLER, C. **The liver**. London: Academic Press, 1964. v. 2, p. 674.

RUI, L. A.; SILVA, E. A.; SILVA, T. C.; PORTELA, T. C. L.; SILVA, A. P.; COGLIATI, B.; DAGLI, M. L. Z.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Cirrhosis in rats does not resolve in the long-term after induction by thioacetamide model. **Journal of Morphological Science**, v. 31, n. 1, p. 33-41.

SAKAIDA, I.; MATSUMURA, Y.; AKIYAMA, S.; HAYASHI, K.; ISHIGE, A.; OKITA, KIWAMU. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. **Journal of Hepatology**, v. 28, p. 298-306, 1998.

SALGADO, S.; GARCIA, J.; VERA, J.; SILLER, F.; BUENO, M.; MIRANDA, A.; SEGURA, A.; GRIJALVA, G.; SEGURA, J.; OROZCO, H.; HERNANDEZ-PANDO, R.; FAFUTIS, M.; AGUILAR, L. K.; AGUILAR-CORDOVA, E.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activador gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 2, n. 6, p. 545-551, 2006.

SANCHO-BRU., BATALLER, R.; FERNANDEZ-VARO, G.; RAMALHO, L. N.; COLMENERO, J.; MARÍ, M.; JIMÉNEZ, W.; ARROYO, V.; BRENNER, D. A.; GINÈS, P. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 2019-2028, 2007.

SANT'ANNA, L. B.; CARGNONI, A.; RESSEL, L.; VANOSI, G.; PAROLINI, O. Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model. **Cell Transplantation**, v. 20, p. 441–453, 2011.

SANZ, N.; DÍEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ-SIMÓN, L.; ALVAREZ, A.; CASCALES, M. Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1384, n. 1, p. 66-78, 1998.

SCHAEFER, B.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; MERAZ-CRUZ, N.; REYES-ROMERO, M. A.; HERNANDEZ-NAZARA, Z. H.; DOMINGUEZ-ROSALES, J. A.; SCHUPPAN D.; GREENWEL, P.; ROJKIND, M. Reciprocal modulation of matrix metalloproteinase-13 and type I collagen genes in rat hepatic stellate cells. **The American Journal of Pathology**, v. 162, n. 6, p. 1771-1780, 2003.

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M.; TUSHUIZEN, M. E.; TEERLINK, T.; HEINE, R. J. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 22, n. 6, p. 437-443, 2006.

SCHUPPAN, D.; STROBEL, D.; HAN, E. G. Hepatic fibrosis: therapeutic strategies. **Digestion**, v. 59, p. 385-390, 1998.

SCHUPPAN, D.; CHO, J. J.; JIA, J. D.; HAHN, E. G. Interplay of matrix and myofibroblasts during hepatic fibrogenesis. **Current Topics in Pathology. Ergebnisse der Pathologie**, v. 93, p. 205-218, 1999.

SCHUPPAN, D.; RUEHL, M.; SOMASUNDARAM, R.; HAHN, E. G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, n. 3, p. 351-372, 2001.

SCHUPPAN, D.; KREBS, A.; BAUER, M.; HAHN, E. G. Hepatitis C and liver fibrosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. S59-67, 2003. Supplement 1.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis, **Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838-851, 2008.

SEKI, T.; IMAI, H.; UNO, S.; ARIGA, T.; GELEHRTER, T. D. Production of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and type-1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in mildly cirrhotic rat liver [abstract]. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 75, n. 5, p. 801-807, 1996.

SELL, S.; LEFFERT, H. L. An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma [abstract]. **Hepatology**, v. 2, n. 1, p. 77-86, 1982.

SEONG, J.; HAN, K. H.; PARK, Y. N.; NAM, S. H.; KIM, S. H.; KEUM, W. S.; KIM, K. S. Lethal hepatic injury by combined treatment of radiation plus chemotherapy in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. **International Journal of Radiation Oncology**, v. 57, n. 1, p. 282-288, 2003.

SEVELIUS, E. Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 521-528, 1995.

SHAO, C. H.; CHEN, S. L.; DONG, T. F.; CHAI, H.; YU, Y.; DENG, L.; WANG, Y.; CHENG, F. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after regional hepatic irradiation ameliorates thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 186, n. 1, p. 408-416, 2014.

SHIOJIRI, N. The origin of intrahepatic bile ducts cells in the mouse. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 79, p. 25-39, 1984.

SILVA, E. A. **Avaliação morfológica e molecular pós-tratamento com os fatores hepatotróficos da cirrose hepática induzida em ratas pela tioacetamida: análise a curto e longo prazo.** 2011. 180 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SINGH, R.; CHOUHAN, U. S.; PUROHIT, S.; GUPTA, P.; KURNAR, P.; KUMAR, A. Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. **Cell and Tissue Banking**, v. 5, p. 129-134, 2004.

SIMILE, M. M.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; DE MIGLIO, M. R.; MURONI, M. R.; CALVISI, D. F.; CARRU, A.; PASCALE, R. M.; FEO, F. 5'-Methylthioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon-tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, v. 34, n. 3, p. 386-394, 2001.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI F.; DENEGRİ, M.; ALBERTINI, A. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 296-305, 2007.

SPIRA, G.; MAWASI, N.; PAIZI, M.; ANBINDER, N.; GENINA, O.; ALEXIEV, R.; PINES, M. Halofuginone, a collagen type I inhibitor improves liver regeneration in cirrhotic rats. **Journal of Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 331-339, 2002.

STEED, D. L.; TRUMPOWER, C.; DUFFY, D.; SMITH, C.; MARSHALL, V.; RUPP, R.. Amnionderived cellular cytokine solution: a physiological combination of cytokines for wound healing. **Eplasty**, v. 8, p. 18, 2008.

STEILING, H.; MÜHLBAUER, M.; BATAILLE, F.; SCHÖLMEICH, J.; WERNER, S.; HELLERBRAND, C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 4, 1233-1241, 2004.

STROMBECK, D.R.; GRIBBLE, D. Chronic active hepatitis in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 380-386, 1978.

SUN, A. Y.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; NEVE, E.; MATSUMOTO, H.; NISHITANI, Y.; MINOWA, Y.; FUKUI, Y.; BAILEY, S. M.; PATEL, V. B.; CUNNINGHAM, C. C.; ZIMA, T.; FIALOVA, L.; MIKULIOKOVA, L.; POPOV, P.; MALBOHAN, I.; JANEBOVA, M.; NESPOR, K.; SUN, G. Y. Etanol and oxidative stress. **Clinical Experimental Research**, v. 25, p. 237-243, 2001.

TAKAMI, T.; TERAİ, S.; SAKAIDA, I. Stem cell therapy in chronic liver disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n.3, p. 203-208, 2012.

TAKASHIMA, S.; ISE, H.; ZHAO, P.; AKAIKE, T.; NIKAIDO, T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. **Cell Structure and Function**, v. 29, p. 73 - 84, 2004.

TAMAGAWA, T.; OI, S.; ISHIWATA, I.; ISHIKAWA, H.; NAKAMURA, Y.. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. **Human Cell**, v. 20, p. 77-84, 2007.

TAN, C. K.; CASTILLO, C.; SO, A. G.; DOWNEY, K. M. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12310-12316, 1986.

TANNO, M.; TAGUCHI, T. Proliferating cell nuclear antigen in normal and regenerating rat livers. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 67, p. 192-200, 1999.

TANNURI, A. C.; COELHO, M. C.; GONÇALVES, J. O.; SILVA, L. F.; BENDIT, I.; TANNURI, U. Effects of selective bile duct ligation on liver parenchyma in young animals: histologic and molecular evaluations. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 47, n. 3, p. 513-522, 2012.

TARLÁ, M. R.; RAMALHO, F.; RAMALHO, L. N. Z.; CASTRO E SILVA, T.; BRANDÃO, D. F.; FERREIRA, J.; CASTRO E SILVA, O.; ZUCOLOTO, S. Cellular aspects of liver regeneration. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 63-66, 2006. Suplemento 1.

TERAI, S.; ISHIKAWA, T.; OMORI, K.; AOYAMA, K.; MARUMOTO, Y.; URATA, Y. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. **Stem Cells**, v. 24, p. 2292-2298, 2006.

TERUI, Y.; SAITO, T.; WATANABE, H.; TOGASHI, H.; KAWATA, S.; KAMADA, Y.; SAKUTA, S. Effect of angiotensin receptor antagonist on liver fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 4, pt. 1, p. 1022, 2002.

THOMPSON, K.; MALTBY, J.; FALLOWFIELD, J.; MCAULAY, N.; MILLWARD-SADLER, H.; SHERON, N. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. **Hepatology**, v. 28, n. 6, p.1597-1606, 1998.

TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **Journal of Pharmacological Science**, v. 105, p. 215-228, 2007.

TORRES, S.; DÍAZ, B. P.; CABRERA, J. J.; DÍAZ-CHICO, J. C.; DÍAZ-CHICO, B. N.; LÓPEZ-GUERRA, A. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 276, n. 1, p. 155-163, 1999.

TREY, C.; DAVIDSON, C. S. The management of fulminant hepatic failure. **Progress in Liver Diseases**, v.3, p. 282-298, 1970.

TSAMANDAS, A. C.; ANTONACOPOULOU, A.; KALOGEROPOULOU, C.; TSOTA, I.; ZABAKIS, P.; GIANNOPOULOU, E.; LIAVA, A.; TZELEPI, V.; TEPETES, K.; PETSAS,

- T.; KARDAMAKIS, D.; KALOFONOS, H. P. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats: an experimental study. **Hepatology Research**, v. 37, n.9, p. 755-764, 2007.
- TSENG, S. C.; LI, D. Q.; MA, X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 179, p. 325-335, 1999.
- TSOCHATZIS, E. A.; BOSCH, J.; BURROUGHS, A. K. Liver cirrhosis. **Lancet**, v. 383, n. 9930, p. 1749-1761, 2014.
- TSUKAMOTO, A.; KANEKO, Y.; YOSHIDA, T.; ICHINOSE, M.; KIMURA, S. Regulation of angiogenesis in human hepatomas: possible involvement of p53-inducible inhibitor of vascular endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 141, n. 1-2, p. 79-84, 1999.
- TSUJI, H.; MIYOSHI, S.; IKEGAMI, Y.; HIDA, N.; ASADA, H.; TOGASHI, I. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. **Circulatory Research**, v. 106, p. 1613-1623, 2010.
- TÚNEZ, I.; MUNÓZ, M. C.; VILLAVIVENCIO, M. A.; MEDINA, F. J.; PRADO, E. P.; ESPEJO, I.; BARCOS, M.; SALCEDO, M.; FEIJÓO, M.; MONTILLA, P. Hepato- and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 223-228, 2005.
- UPHOFF CC, DREXLER HG. Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 105, p. 28.4.1-28.4.14, 2014
- VA DEN OORD, J. J.; VOLPES, R.; DESMET, V. J. Dendritic cells and the liver. **APMIS**, v. 23, p. 68-76, 1991.
- VASSALLI, J. D.; SAPPINO, A. P.; BELIN, D. The plasminogen activator/plasmin system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 4, p. 1067-1072, 1991.
- VERHEIJEN, J. H.; VISSE, R.; WIJNEN, J. T.; CHANG, G. T.; KLUFT, C.; MEERA KHAN, P. Assignment of the human tissue-type plasminogen activator gene (PLAT) to chromosome 8. **Human Genetics**, v. 72, n. 2, p. 153-156, 1986.
- VERYASOV, V. N.; SAVILOVA, A. M.; BUYANOVSKAYA, O. A.; CHULKINA, M. M.; PAVLOVICH, S. V.; SUKHIKH, G. T. Isolation of mesenchymal stromal cells from extraembryonic tissues and their characteristics. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, n. 1, p. 119 – 124, 2014.
- WALKER, N.; APE, R.; KERLIN, P.; HORN, M.; TINNISWOOD, R.; LYNCH, S.; STRONG, R. Hepatitis B virus infection in liver allografts. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 17, n. 7, p. 666-677, 1993.
- WANG, G. S.; ERIKSSON, L. C.; XIA, L.; OLSSON, J.; STAL, P. Dietary iron overload inhibits carbon tetrachloride-induced promotion in chemical hepatocarcinogenesis: effects on cell proliferation, apoptosis, and antioxidation. **Journal of Hepatology**, v. 30, n. 4, p. 689-698, 1999.

WANG, T.; SHANKAR, K.; RONIS, M. J. J.; MEHENDALE, H. M. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 473-479, 2000.

WANLESS, I. R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 124, p. 1599-1607, 2000.

WATSON, P. J. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression and treatment. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 238-241, 2004.

WILLIAMS, E. J.; BENYON, R. C.; TRIM, N.; HADWIN, R.; GROVE, B. H.; ARTHUR, M. J.; UNEMORI, E. N.; IREDALE, J. P. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. **Gut**, v. 49, n. 4, p. 577-583, 2001.

YAMAGUCHI, Y.; MANN, D. M.; RUOSLATHI, E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. **Nature**, v. 346, n. 6281, p. 281-284, 1990.

YANNAKI, E.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; KAPETANOS, D.; XAGORARI, A.; IORDANIDIS, F.; BATSI, I. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. **Experimental Hematology**, v. 34, p. 1583-1587, 2006.

YIN, C.; EVASON, K. J.; ASAHINA, K.; STAINIER, D. Y. R. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 5, 2013.

YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; YOSHII, J.; IKENAKA, Y.; NOGUCHI, R.; HICKLIN, D. J.; WU, Y.; YANASE, K.; NAMISAKI, T.; YAMAZAKI, M.; TSUJINOUE, H.; IMAZU, H.; MASAKI, T.; FUKUI, H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. **Gut**, v. 52, n. 9, p. 1347-1354, 2003.

ZARAGOZA, A.; ANDRÉS, D.; SARRIÓN, D.; CASCALES, M. Potenciation of thioacetamide by phenobarbital pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. **Chemico-Biological Interactions**, v. 124, n. 2, p. 87-101, 2000.

ZHANG, L. P.; TAKAHARA, T.; YATA, Y.; FURUI, K.; JIN, B.; KAWADA, N.; WATANABE, A. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells. **Journal of Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 703-711, 1999.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal research**, v. 1, p. 3-14, 2006.

ZHANG, B.; INAGAKI, M.; JIANG, B.; MIYAKOSHI, M.; ARIKURA, J.; OGAWA, K. Effects of bone marrow and hepatocyte transplantation on liver injury. **Journal of Surgery Research**, v. 157, p. 157-172, 2009.

ZHANG, D.; JIANG, M.; MIAO, D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. **PLoS One**, v. 6, n. 2, e.16789, 2011.

ZHAO, P.; ISE, H.; HONGO, M.; OTA, M.; KONISHI, I. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. **Transplantation**, v. 79, p. 528-535, 2005.

ZHENG, W. D.; ZHANG, L. J.; SHI, M. N.; CHEN, Z. X.; CHEN, Y. X.; HUANG, Y. H. WANG, X. Z. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 12, p. 1753-1758, 2005.