MARCIO APARECIDO PEREIRA

**Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a
progressão da fibrose hepática em ratos**

São Paulo
2016

MARCIO APARECIDO PEREIRA

**Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a
progressão da fibrose hepática em ratos**

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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo
2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3423
FMVZ

Pereira, Marcio Aparecido
Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a progressão da fibrose
hepática em ratos / Marcio Aparecido Pereira. -- 2016.
63 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Fígado. 2. Ligadura do ducto biliar. 3. Fibrose. I. Título.

São Paulo, 30 de abril de 2015
CEUA N 3248040214

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Maria Angélica Miglino

Executante: MARCIO APARECIDO PEREIRA

Depto/Disc: Departamento De Cirurgia

Pesquisadores associados: Durvanei Augusto Maria (instituto Butantan); Luiz Augusto Carneiro D Albuquerque (fmusp);

Márcia Saldanha Kubrusly (fmusp); Lucas Souto Nacif (fmusp); Maria Angelica Miglino (orientador)

Título do projeto: "Terapia Celular na Cirrose Hepática Experimental em Ratos com Células-Tronco Mesenquimais do Broto Hepático".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A terapia celular tem sido o alvo de muitos trabalhos atualmente, tendo em vista o potencial de diferenciação e regeneração de tecidos inerentes a alguns tipos celulares. Muitos estudos tem demonstrado o potencial de diferenciação das células tronco embrionárias em hepatócitos in vitro, entretanto maiores esclarecimentos sobre os detalhes deste processo podem ser obtidos com a realização de experimentos com modelos animais de disfunções hepáticas, o que pode ser uma alternativa para aplicações terapêuticas futuras. Objetiva-se avaliar o potencial terapêutico das células tronco embrionárias do broto hepático de 12,5 dias de ratos no modelo de cirrose submetido a ligadura do ducto biliar.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 12/03/2014, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Tantiuri

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEREIRA, Marcio Aparecido

Título: Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a progressão da fibrose hepática em ratos

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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma colaboram para que ele acontecesse.

Dedico a todos possam ter algum benefício sobre ele no futuro.

Dedico a todos os aqueles inocentes animaizinhos que contribuíram tão grandemente, para o meu próprio crescimento e para realização dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois tudo é **Dele** por **Ele** e pra **Ele**, pois todo meu trabalho e minha vida é para a Honra e Gloria do Seu Nome.

Agradeço aos meus pais, **Benevenuto Pereira Lopes** e **Divina de Souza Pereira**, aos meus dez irmãos sei que todos tiveram papel importante para eu chegar até aqui.

Agradeço à minha família, minha amada esposa **Valeria dos Santos Pereira**, pelo seu amor e pelo seu suporte em todos os sentidos, e aos meus quatro filhos **Davi Pereira, Ruan Pedro Pereira, Ingridi Pereira, Caio Pereira**, pelos momentos que suportaram minha ausencia e pelo revigoramento que eles me oferecem com sua energia pura infantil.

Agradeço à minha orientadora, **Prof. Dra. Maria Angelica Miglino** por ter me oferecido a oportunidade de me aproximar do meu objetivo, por ser como um farol no mar pra mim. Por ter confiado na minha capacidade desde o inicio, pela sua determinação e seu estímulo para eu pudesse superar minhas dificuldades. Sempre me lembrarei da sua maneira decidida e confiante de avançar na vida.

Ao **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**, pela sua imensa e fundamental contribuição para realização deste trabalho, pela sua paciência e generosidade.

A **Dra. Sonia Will** pela contribuição pelas palavras de incentivo, pela ajuda na organização de ideias.

A **Dra. Ana Claudia Carreira**, por toda dedicação e empenho e paciência em ajudar nas análises deste trabalho.

Ao Prof Guerra pela sua atenção e prestatividade com suas considerações auxiliando me neste trabalho desde o inicio.

A **Dra. Mariana Matera** pela sua contribuição pela sua gentileza em dispor do seu tempo oferecendo a sua ajuda preciosa.

A **Prof. Dra. Claudia Mori**, pela contribuição com os animais do experimento.

Ao técnico **Ronaldo Agostinho**, pela ajuda pela instrução tão importante no inicio deste trabalho.

As funcionarias **Dra. Rose Eli** por sua contribuição e **Jaqueline Santana**.

Aos colegas de laboratório **Lara, Carla, Renam, Adriana, Cesar, Patricia, Nathia, Ana Carolina, Luciano, Natal, M.A, Paulo, Amilton, Maranhão,**

especialmente a **Jessica**, sempre demonstrando interesse em ajudar com paciência e dedicação.

Ao colega de laboratório **Rodrigo Barreto** ao qual tive o imenso prazer de conhecer neste ultimo ano de trabalho, mas que representou uma importancia fundamental para conclusão deste trabalho, aprendi com voce muitas coisas que vão além de tecnicas laboratoriais, as quais usarei para sempre na minha vida. Muito obrigado

A bibliotecária **Elza** por toda sua orientação e paciência.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, ou apenas para tornar mais prazeroso o ambiente de trabalho simplesmente com a sua presença, no entanto minha gratidão a essas pessoas não alcança palavras, posso por um lapso de memória ter cometido a injustiça de não ter citado alguma dessas pessoas, se realmente houve esta falha por favor me perdoe.

Meu muito obrigado a todos.

Muito Obrigado pela oportunidade.

Obrigado a CAPES pela concessão da bolsa.

RESUMO

PEREIRA, M. A. **Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a progressão da fibrose hepática em ratos.** [Treatment with embryonic liver derived cell retards hepatic fibrosis progression in rats]. 2016. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células derivadas de fígado embrionário tanto de animais quanto de humanos tem sido cada vez mais estudadas devido ao seu potencial antiinflamatório, imunomodulador e regenerativo, demonstrado as mesmas bipotencial de diferenciação em hepatócitos e colangiócitos. Na presente pesquisa utilizou-se células derivadas de fígados embrionários de ratos com 14,5 dias de gestação. As células apresentaram marcadores de células progenitoras hepáticas, bem como marcadores de células hepáticas e biliares diferenciadas confirmando, seu bipotencial. A terapia celular utilizando as células supracitadas, reduziu significativamente a progressão da fibrose hepática, diminuindo a inflamação e ainda estimulando a regeneração hepática de ratos submetidos à cirrose por ligadura do ducto biliar. As análises realizadas mediante avaliação quantitativa pela técnica de morfometria, demonstraram redução da deposição de fibras de colágeno, bem como menor proliferação de ductos biliares nos animais tratados. Os resultados foram ainda complementados por análise semiquantitativa, a qual avaliou a intensidade da necroinflamação dos tecidos hepáticos analisados, apontando menor escore de inflamação dos animais tratados. As células poderão ter efeito benéfico para o tratamento de doenças hepáticas crônicas, que estimulam a formação de fibrose. A cirrose é o estágio final comum à doenças hepáticas crônicas por causadas por fatores de diversas etiologias. Esta ocupa a decima quarta causa mundial de mortalidade em humanos, sendo que o único tratamento definitivo atualmente é transplante do órgão. Entretanto o número de transplantes está longe de suprir a demanda atual, visto que há um déficit de doadores do órgão. Terapias que possam oferecer uma alternativa de tratamento confiável, segura e acessível são bastante oportunas. Nossos resultados sugerem que as células utilizadas neste trabalho podem modular a fibrogênese, e consequentemente retardar o estabelecimento da cirrose em doenças hepáticas crônicas.

Palavras-chave: Broto Hepático.Ligadura de ducto biliar.Fibrose Hepática.

ABSTRACT

PEREIRA, M. A **Treatment with embryonic liver derived cell retards hepatic fibrosis progression in rats** [Tratamento com células derivadas do fígado embrionário retarda a progressão da fibrose hepática em ratos]. 2016. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Studies on human and animal embryonic liver stem cells have been growing due to its anti-inflammatory, immunomodulatory and regenerative potential. These cells show also a bipotential do differentiate into hepatocytes and cholangiocytes. In the present study, it was used rodent embryonic liver with 14.5 of gestation. The cells presented hepatic progenitor, as well adult hepatic and biliary cells markers, confirming their bipotential. Previous studies with these cells in therapy decreased hepatic fibrosis progression in rat models submitted to cirrhosis by biliary duct ligation. Quantitative analysis was performed by morphometry showed decreased collagen fibers deposition and lower proliferation of biliary ducts in treated animals. Results were complemented with semiquantitative analysis with evaluation of necroinflammation of the analyzed hepatic tissues, in which a decreased inflammation score was observed. Cirrhosis is a common final stage for chronic hepatic diseases caused by different factors in several etiologies. It occupies the 14th world cause of mortality in human. However, the number of liver transplants is insufficient for current demand, caused by deficit in organs donors. Therapies that could offer an alternative for a reliable, safe and accessible treatment is opportune. Our results suggest that cells used in this study can modulate fibrogenesis and consequently delay the establishment of cirrhosis in chronic liver diseases.

Keywords: Liver Bud. Bile Duct Ligation. Hepatic Fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia do embrião e do fígado embrionário do rato com 14,5 dias de gestação	36
Figura 2 - Fotomicrografia de células derivadas de fígado embrionário de rato com 14,5 dias de gestação	37
Figura 3 - Histograma de imunofenotipagem das células de fígado embrionário de ratos com 14.5 dias de gestação por citometria de fluxo.....	38
Figura 4 - Ensaio de tumorigenese no camundongo nude.....	39
Figura 5 - Fotodocumentação macroscópica da cirurgia de LDB.....	40
Figura 6 - Fotodocumentação macroscópica dos fígados do diferentes grupos experimentais	42
Figura 7 - Fotomicrografias do parênquima hepático	43
Figura 8 – Graduação e estadiamento da fibrose /cirrose os grupos sham (G1), controle cirurgia (G2) e terapia celular (G3).	44
Figura 9 – Fotomicrografias das reações de imunohistoquímica para os anticorpos anti-CK19, anti- α -SMA e anti-PCNA.....	45
Figura 10 – Deposição de colágeno nos fígados dos diferentes grupos estudados..	47
Figura 11 - Quantificação de colágeno interlobular entre os grupos sham (G1), controle cirurgia (G2) e terapia celular (G3).	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA	16
2.2	FIBROSE HEPÁTICA	18
2.3	DOENÇA HEPÁTICA.....	20
2.3.1	Cirrose Hepática	20
2.4	MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NA INDUÇÃO DE CIRROSE ...	22
2.5	CÉLULAS TRONCO E TERAPIA CELULAR.....	23
3	JUSTIFICATIVA	26
4	HIPÓTESE.....	27
5	OBJETIVOS	28
5.1	OBJETIVO GERAL.....	28
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
6.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
6.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS.....	29
6.2.1	Morfologia Celular e Microscopia Eletrônica de Varredura	30
6.2.2	Caracterização Celular por Citometria de Fluxo	30
6.2.3	Ensaio de Tumorigenese	31
6.3	LIGADURA DO DUCTO BILIAR E TERAPIA CELULAR.....	31
6.3.1	Eutanásia.....	32
6.3.2	Análise Histopatológica do Fígado	32
6.3.3	Gradação e Estadiamento da Fibrose/Cirrose.....	32
6.3.4	Imunohistoquímica.....	33
6.3.5	Quantificação de Colágeno Interlobular.....	33

7	RESULTADOS	35
7.1	ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DO FÍGADO EMBRIONÁRIO	35
7.1.1	Cultivo e Morfologia Celular.....	36
7.1.2	Caracterização por Citometria de Fluxo.....	37
7.1.3	Ensaio de Tumorigenese	38
7.2	ESTABELECIMENTO DO MODELO DE CIRROSE.....	39
7.2.1	Avaliação Clínica e Avaliação Anatômica Macroscópica dos Animais	40
7.2.2	Análise Histopatológica.....	43
7.2.3	Graduação e Estadiamento da Fibrose/Cirrose	43
7.2.4	Imunohistoquímica.....	45
7.2.5	Quantificação de Colágeno Interlobular.....	46
8	DISCUSSÃO	49
9	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A cirrose hepática é uma doença de ocorrência global, com mortalidade crescente em muitos países, sendo considerada um grande problema de saúde. Apenas no ano de 2010, a doença causou mais de um milhão de mortes em todo o mundo, representando a 14^a causa de morte mundial (LOZANO et al., 2012; TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014). Nos países ocidentais, uma das maiores causas de cirrose hepática é o consumo excessivo de álcool. Outras doenças tais como, colestase biliar, doenças metabólicas e hepatites viral e autoimune também podem estar entre as principais causas (AHMED et al., 2014). A doença é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular no órgão, levando à uma distorção normal do parênquima hepático, formando nódulos fibroticos de regeneração hepática, com perda da fenestração sinusoidal, e consequente necrose de hepatócitos (HABEEB et al., 2015). Tais alterações levam à disfunções na circulação sanguínea, as quais consequentemente resultam no aumento da pressão portal, levando a ascite, disfunções renais (síndrome hepatorenal) e pulmonares (síndrome hepatopulmonar), culminando com a perda da função do órgão (BHATIA et al., 2014).

Apesar dos avanços na compreensão dos eventos envolvidos na progressão e tratamento da cirrose, o transplante de fígado ainda continua sendo a única opção de tratamento definitivo (ALQAHTANI; LARSON, 2011; ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014). Entretanto a escassez de doadores é a maior barreira encontrada para o sucesso de tal procedimento. Além disso as complicações cirúrgicas, o risco de rejeição imunológicas, também são fatores que dificultam sucesso terapêutico do transplante (WOO et al., 2013). Sendo assim novas alternativas de tratamento da doença constituem uma necessidade emergente.

Frente ao grave problema de saúde mundial que a cirrose representa, vários pesquisadores têm buscado diferentes formas de tratamento, depositando suas expectativas na terapia celular. Diversas fontes de células tronco inclusive as progenitoras hepáticas têm sido utilizadas, na tentativa de oferecer avanços no tratamento da doença. O transplante de hepatócitos tem sido proposto como uma opção terapêutica para tratamento de disfunções hepáticas (FITZPATRICK; MITRY; DHAWAN, 2009; CHINNICI et al., 2015). Entretanto a dificuldade para cultivar e

expandir as células viáveis em número suficiente para transplante, ainda constitui uma barreira a ser superada. Outro fator limitante é a falta de doadores, ainda que possa haver a doação parcial órgão, destinada à coleta e isolamento dos hepatócitos (BHATIA et al., 2014).

As células tronco podem ser consideradas atualmente a mais atraente opção de tratamento para doenças hepáticas. Alguns trabalhos têm demonstrado resultados efetivos mediante sua utilização (LANZONI et al., 2013). Uma boa parte das recentes pesquisas têm investigado a atuação da células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, aplicadas ao tratamento de doenças hepáticas, demonstrando a capacidade de diferenciação das mesmas em linhagens de células hepáticas (LIHUA et al., 2015). Entretanto, existe a hipótese de que estas células tenham uma importante contribuição na fibrogenese hepática (SANT'ANNA et al., 2011; XU et al., 2015).

Por outro lado, a utilização de células tronco ou progenitoras hepáticas derivadas de fígado embrionário, desperta cada vez maior interesse dos pesquisadores, devido ao seu potencial terapêutico, ao qual já foi relatado em alguns modelos animais, bem como no tratamento de doenças do fígado em humanos (YOVCHEV et al., 2007; SEMERARO et al., 2013). Estas células apresentam bipotencial, sendo capazes de expressar anticorpos para marcar hepatócitos e colangiócitos. Além disso podem ser positivas para anticorpos específicos de células tronco hepáticas, tais como, AFP, ALB, c-kit, c-Met, Nestin, CD 44, , CK 7, CK 18 e CK19 (OERTEL, 2011; BIN et al., 2012; GONGH et al., 2013). As células tronco fetais hepáticas, demonstraram ainda propriedades apropriadas para o tratamento de disfunções pancreáticas tais como diabetes, devido a origem embrionária comum entre o fígado e o pâncreas (SEMERARO et al., 2013).

Em ratos o período embrionário, estende até o decimo sexto dia de gestação (EVANS; SACK, 1973). No período entre 14 e 15 dias de gestação, a maioria das células hepáticas são células tronco progenitoras, com bipotencial expressando (AFP e CK19). Estas células após serem aplicadas em animais com lesões hepáticas graves proporcionaram melhoras na função hepática, assim como resultam na diminuição na taxa de mortalidade destes animais (OERTEL et al., 2006; MACHIMOTO et al., 2007).

Estas células após serem aplicadas em animais com lesões hepáticas graves

proporcionaram melhoras na função hepática, assim como na diminuição na taxa de mortalidade (OERTEL et al., 2006; MACHIMOTO et al., 2007).

As células tronco hepáticas isoladas de fetos humanos, apresentam ótima capacidade de proliferação, mesmo após passarem pelo processo a criopreservação, sendo menos imunogênicas do que as células derivadas de tecidos adultos (HABEEB et al., 2015). Estas células isoladas de fetos humanos com idade gestacionais entre 10 a 18 semanas demonstraram bipotencial, e foram capazes de se diferenciar em hepatócitos e células biliares (VALI et al., 2014).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o resultado do tratamento realizado mediante a aplicação de células derivadas de fígado de fetos de ratos com 14,5 dias de gestação, em ratos pós ligadura do ducto biliar comum, visando diminuir a progressão da fibrose e da inflamação hepática e consequentemente limitar a evolução da cirrose, bem como estimular a regeneração dos hepatócitos, considerando o potencial de diferenciação destas células.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo apresenta informações que contextualizam as abordagens, e oferecem dados para a compreensão dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho.

2.1 ANATOMIA E FISILOGIA

O fígado é o maior órgão interno do corpo, representando nos ratos adultos aproximadamente 5% do peso corpóreo. É um órgão multilobado, assim como na maioria dos mamíferos. Está localizado na extremidade cranial do abdome, relacionado cranialmente com o diafragma e caudalmente com o estômago e intestino.

O fígado possui duas faces (diafragmática e visceral) e quatro margens (dorsal, ventral, direita e esquerda). Da face diafragmática se desprende o ligamento coronário, que fixa o órgão ao diafragma. Na face visceral se encontra o hilo, por onde passa a artéria hepática e a veia porta hepática. Na margem dorsal do fígado localiza-se o sulco que permite a passagem da veia cava caudal, e na margem ventral está o ligamento redondo do fígado, que fixa o órgão ao assoalho do abdômen. À direita, o ligamento lateral direito fixa o fígado na parede abdominal e à esquerda o ligamento lateral esquerdo prende o fígado ao diafragma. Do ligamento redondo emerge o ligamento, que conecta o fígado ao diafragma (I.C.V.G.A.N., 2005).

É dividido por fissuras em lobos, sendo: lobo medial, lobo lateral direito, lobo lateral esquerdo e lobo caudado, do qual se projeta o processo caudado (ALLER, 2012).

Existe uma correlação entre os lobos e setores do fígado dos ratos com o fígado dos humanos. Apesar da diferença quanto ao número de lobos entre as espécies, ambos pertencem a mesma Classe *Mammalia*, tendo portanto seu desenvolvimento embriológico semelhante (KOGURE et al., 1999). O lobo medial é o maior, representando cerca de 38% do peso do fígado. O lobo lateral esquerdo

representa aproximadamente 30% do peso do órgão. O lobo direito compreende cerca de 22% do peso, é dividido por uma fenda horizontal em duas partes a dorsal e ventral. O lobo caudado compreende 8-10% do peso, em forma de discos, cada um representando 4% de a massa do fígado.; (KOGURE et al., 1999; MARTINS; NEUHAUS, 2007).

Os lobos hepáticos são por sua vez subdivididos em unidades estruturais denominados lóbulos hepáticos. Estes são descritos como unidade funcional do fígado. São estruturas hexagonais formadas pelos os hepatócitos, apresentam uma veia central circundada por seis espaços porta. O espaço porta ou tríade portal é formado por um ramo da veia porta, uma artéria hepática e um ducto biliar (MARTINS; NEUHAUS, 2007). Diferente da maioria das espécies de mamíferos, o rato não possui vesícula biliar. A bile é drenada por ramos biliares que seguem para os ductos biliares de cada lóbulo hepático, convergindo para um ducto biliar do lobo referente, que se unem no lobo caudado para formar o ducto biliar comum.

O ducto biliar comum varia entre 12 a 16 mm de comprimento na citada espécie, e de 0,6 a 1 mm de diâmetro, mas pode ser até 45 milímetros de comprimento. Este dispõe se à esquerda da artéria hepática e da veia porta na superfície do lóbulo caudado, para se conectar ao pâncreas (HEBEL; STROMBERG, 1986; BEGUM et al., 2010)

O parênquima do fígado é constituído principalmente pelos hepatócitos, que ocupam aproximadamente 78 % do seu volume. Entre outros tipos celulares não parenquimais, encontram se as demais células hepáticas tais como, colangiócitos, células endoteliais, estreladas hepáticas, células de Kupffer e células do sanguíneas (TANIMIZU; MIYAJIMA, 2004; MANSUROGLU et al., 2009). O parênquima hepático é formado pelos hepatócitos que são células poliédricas, possuem um ou dois núcleos com um ou dois nucléolos. Estão dispostos em placas anastomosadas orientadas radialmente a partir de uma veia central e entrelaçadas de forma ordenada por sinusóides, permeados pelos canais biliares (GUYTON; HALL, 2002). Pequenos canais intra-hepáticos, compostos de células epiteliais, os colangiócitos, constituem uma rede tridimensional de vias biliares conhecidas como a árvore biliar, responsáveis pela drenagem da bile secretada pelos hepatócitos conduzida pelos canalículos biliares até a periferia do lóbulo hepático, onde se ligam aos ductos biliares de maior calibre (TABIBIAN et al., 2013). Por sua vez encontram se os sinusóides, que são capilares revestidos por uma camada descontínua de células

endoteliais compondo um endotélio intensamente fenestrado, encarregados levar sangue rico em nutrientes e oxigênio para o interior do parênquima. Eles interligam a artéria hepática e a veia porta à veia central. Não possuem parede estruturada e são revestidos por dois tipos de células: as células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e os macrófagos específicos hepáticos denominados células de “Kupffer” (GUYTON; HALL, 2002). Entre os hepatócitos e os sinusóides, encontra-se um espaço estreito, denominado espaço de “Disse”, onde se localizam as células estreladas hepáticas, principais envolvidas no processo de fibrogenese (PAVANATO et al., 2003; FRIEDMAN et al., 2013). Outro importante tipo de células encontradas são as células ovais, encontradas no fígado junto aos canais de Hering na interface hepatobiliar dentro do lóbulo (KHAN et al., 2012). Estas são descritas como células hepáticas progenitoras multipotentes ou células tronco hepáticas, capazes de se diferenciar em hepatócitos e colangiócitos e, sob condições de injúrias severas a regeneração do órgão (TANIMIZU; MIYAJIMA, 2004; OERTEL, 2011).

2.2 FIBROSE HEPÁTICA

A fibrose hepática é descrita como um mecanismo de reparação tecidual que acontece em resposta a uma lesão no fígado. É preciso que fique claro que fibrose tecidual não visa causar a doença, mas proteger o organismo com uma resposta tecidual à lesão (FRIEDMAN et al., 2013). Sob circunstâncias normais, o volume de matriz extra celular (MEC) que se acumula em resposta a lesão, é digerido e removido. No caso de uma lesão aguda leve ao órgão, a fibrogênese é controlada por enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, que degradam o excesso de matriz extracelular (MEC) em processo fisiológico do organismo. Injúrias crônicas ao fígado como as viroses, toxinas, colestases, doenças metabólicas e autoimunes, levam a falha no mecanismo normal resultando na deposição desordenada de MEC, composta principalmente por colágeno tipo I, III e IV, fibronectina, elastina, laminina, e proteoglicanos (FRIEDMAN, 2008; DUVAL et al., 2015). O colágeno tipo IV associado a laminina tem uma importante participação na constituição da membrana basal dos sinusóides, uma membrana porosa e fenestrada, a qual proporciona maior contato com a membrana dos hepatócitos. Os outros tipos de colágeno (I, III), em

condições fisiológicas limitam-se aos espaços porta e a veia central. Em condições fisiológicas a MEC corresponde a menos do que 3% do parênquima (BEDOSSA; PARADIS, 2003).

Em casos patológicos, ocorre uma deposição desordenada de MEC no espaço de Disse. Isto implica no acúmulo de colágeno, principalmente, do tipo I e III, formando uma estrutura de fibrosa que, primeiramente, interfere na membrana basal dos sinusóides, ocasionando a capilarização dos sinusóides, ou seja, a perda das fenestrações sinusoidais (FRIEDMAN, 2008). Desta forma, os sinusóides tornam-se semelhantes a um capilar, o que resulta em deficiência no suprimento de oxigênio e nutrientes aos hepatócitos. Além disto, o progresso na deposição de MEC, ocasiona a distorção na arquitetura parenquimal, apoptose de hepatócitos, hipertensão portal, redistribuição vascular, alterando gravemente a função hepática (ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

Vários tipos celulares estão envolvidos na fibrogênese. As células estreladas hepáticas (CEHs) são consideradas as principais células envolvidas neste evento, embora haja a participação de fibroblastos portais, perivasculares e células derivadas da medula óssea (FRIEDMAN, 2008; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). As CEHs em situação fisiológica apresentam-se quiescentes tendo como função principal armazenar vitamina A. Quando ocorre uma lesão, são ativadas por mediadores químicos que levam a perda progressiva de retinóides, passando a apresentar um fenótipo de miofibroblastos, potencializando a produção e deposição de MEC.

Como resposta a lesão hepática, ocorre um recrutamento de células inflamatórias, incluindo as células de Kupffer, que são consideradas as principais indutoras de ativação das CEHs. Estas células secretam citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, tais como, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento (TGF- β), fator de necrose tumoral (TNF- α). Estes fatores ativam as CEHs, inibem a ação da collagenase, além de diminuir a síntese de DNA, o que induz os hepatócitos à apoptose e inibem a apoptose espontânea das CEHs ativadas (TSOCHATZIS; BOSCH; BURROUGHS, 2014).

A TGF- β é conhecida por ser um mediador central da iniciação e da manutenção das doenças fibróticas em vários órgãos. Estudos em modelos animais oferecem evidências de que esta via é super estimulada em casos de fibrose. O

controle desta, pode oferecer uma opção de atrativa de tratamento para fibrose hepática, entretanto é necessário considerar suas atividades homeostáticas, regulação imunológica e supressão de tumor. Portanto deve se avaliar as possibilidades dos efeitos colaterais da inibição sistêmica desta via (FRIEDMAN et al., 2013).

2.3 DOENÇA HEPÁTICA

2.3.1 Cirrose Hepática

A Organização Mundial da Saúde definiu em 1977, a cirrose como "Um processo difuso caracterizado por fibrose com a conversão da arquitetura hepática normal em nódulos estruturalmente anormais, uma condição progressiva crônica que resulta em falência de células hepáticas e hipertensão portal" (ANTHONY et al., 1977). Estes conceitos ainda continuam aceitos, entretanto a história natural da cirrose mudou significativamente nos últimos anos, de forma que é incorreto afirmar que todos os casos de cirrose levam a falha de células hepáticas e hipertensão portal (HYTIRIGLOU et al., 2012).

A cirrose é uma doença de abrangência mundial que acomete milhões de pessoas por ano representando a 14^a causa de morte mais comum em adultos (BERARDIS et al., 2015). Em crianças de até 1 ano de idade, a cirrose (causada por colestase biliar) é responsável por um grande número de óbitos, sendo a principal indicação de transplante hepático na infância (PEREIRA et al., 2010).

A mortalidade causada por cirrose hepática vem aumentando constantemente em todo o mundo nos últimos 30 anos. Até o ano 2010, já havia ultrapassado um milhão de mortes por ano (ZATOŃSKI et al., 2010; BLACHIER et al., 2013). No Brasil está entre as quatro maiores causas de morte, e apenas na região Sudeste, a taxa de mortalidade por cirrose foi igual a de doenças isquêmicas do coração, ou seja, (6,9 óbitos/100 mil habitantes)(BRASIL, 2010; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ANÁLISE DE SITUAÇÃO DE SAÚDE., 2012).

O consumo excessivo de álcool, seguido por, hepatite viral (B e C) e autoimune, doenças metabólicas e colestase biliar, são as principais causas de cirrose (AHMED et al., 2014). Independentemente do fator etiológico, a cirrose representa a condição final comum da agressão hepática crônica não tratada (FRIEDMAN, 2008). Entretanto a classificação da doença, o diagnóstico e tratamento são baseadas principalmente na etiologia (HYTIROGLOU et al., 2012).

A sintomatologia clínica da cirrose, pode variar amplamente dependendo da etiologia e da evolução da doença; podendo ser assintomática ou apresentar diversos sintomas, tais como, hipertensão portal e encefalopatia hepática (HYTIROGLOU et al., 2012)

Em decorrência da cirrose vários sistemas do organismo podem ser acometidos, por exemplo, a cardiomiopatia cirrótica no sistema cardiocirculatório; síndrome hepatorenal no sistema renal; síndrome hepatopulmonar no sistema pulmonar; e encefalopatia hepática no sistema neurológico. Geralmente também estão presentes algumas alterações metabólicas, como a ascite, icterícia e dificuldade no metabolismo de drogas. A cirrose pode evoluir para o hepatocarcinoma, sendo esta uma das mais graves consequências (SRINIVAS et al., 2012).

O diagnóstico pode feito métodos não invasivos, tais como, tomografia computadorizada e ressonância magnética, ambos com sensibilidade e especificidade elevados nos resultados. A ultrassonografia também tem sido utilizada, no entanto com menor acurácia nos resultados. Deve-se ainda considerar a mensuração dos níveis de indicadores bioquímicos de lesão hepática tais como as enzimas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA), que estarão aumentados no caso de injúria ao órgão (GIANNINI; TESTA; SAVARINO, 2005; JUNG; KIM, 2012; KANG; KIM; AHN, 2014). A biópsia hepática, é importante para confirmar casos cirrose em pacientes com função hepática compensada, mesmo antes que os pacientes apresentem sinais claros da doença como ascite, coagulopatias ou nódulos de regeneração hepáticos. Para biópsia uma amostra do fígado pode ser obtida por uma laparoscopia percutânea guiada por radiografia, um procedimento minimamente invasivo (SCHUPPAN; AFDHAL, 2008; KANG; KIM; AHN, 2014).

Não há um tratamento padrão definido para o controle da cirrose. As causas e o estágio da doença determinam a conduta terapêutica. Primeiramente trata-se a

causa básica da doença, tais como interrupção da ingestão de álcool (cirrose alcoólica) ou tratamento com antivirais (contra infecções por vírus da hepatite B e C). Essas medidas são consideradas eficientes no controle de uma parte considerável dos casos de cirrose hepática. Os agentes antivirais mais utilizados, são, IFN- α , ribavirina, lamivudina, adefovir, entecavir (BERENGUER; SCHUPPAN, 2013). Em segundo plano, o tratamento visa inibir a ativação e induzir à apoptose as CEHs. Por meio do controle da inflamação e da resposta imune, que são causas diretas da lesão aos hepatócitos e da ativação das CEHs. Dentre os mecanismos da inflamação e da resposta imune, o controle da liberação de TGF- β e PDGF leva à inativação das CEHs; e algumas citocinas e fatores de crescimento, como a IFN- α e IFN- γ , podem ser utilizadas para induzir as CEHs a apoptose. Drogas antiinflamatórias como, celecoxib, azatioprina, rapamicina e agentes antioxidantes (taurina e vitamina E) também tem demonstrado algum efeito antifibrótico no tratamento da cirrose (ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014).

Alguns medicamentos fitoterápicos têm sido utilizados tratamento da cirrose, a silimarina é um dos mais utilizados. Pesquisadores obtiveram resultados significativos com uso da silimarina no tratamento cirrose experimental em ratos induzidos por tioacetamida (CHEN et al., 2012).

Apesar dos avanços obtidos no controle da doença e das suas complicações, o transplante hepático ainda é considerado a única opção terapêutica definitiva (FRIEDMAN, 2004; ALQAHTANI; LARSON, 2011). Entretanto algumas limitações são encontradas, sendo a escassez de doadores a principal delas. Além disso as possíveis complicações relacionadas à cirurgia, rejeição imunológica e alto custo médico que envolve o procedimento, também são barreiras frequentemente encontradas (WOO et al., 2013).

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS NA INDUÇÃO DE CIRROSE

Modelos experimentais são cada vez mais utilizados pelas suas importantes contribuições para pesquisa biomédica, possibilitando conhecimento das características do desenvolvimento da doença, sugerindo novas alternativas de tratamento, embora possam haver limitações (YAP, 2012).

O rato tem sido um modelo experimental amplamente utilizado, particularmente na utilização de técnicas cirúrgicas, pela facilidade de manuseio e baixo custo de manutenção (MARTINS; NEUHAUS, 2007). Além de pesquisas relacionadas ao estudo de disfunções hepáticas, tais como cirrose, regeneração hepática, neoplasias do fígado, transplante, estudos relacionados à imunologia, entre outras doenças hepáticas, o rato é seguramente o modelo mais utilizado (MARTINS; NEUHAUS, 2007).

Para a indução de cirrose em ratos os modelos mais utilizados são: a administração tetracloreto de carbono (CCL4)) (JIMÉNEZ et al., 1992; BONA et al., 2012), de tioacetamida (TAA), (ABUL et al., 2002; WIJESUNDERA et al., 2014) e a ligadura do ducto biliar (LDB).

A LBD foi inicialmente descrita por Cameron e Oakley em 1932 em camundongos. Posteriormente com base neste estudo, o modelo foi estabelecido em ratos (KOUNTOURAS; BILLING; SCHEUER, 1984). Desde então o modelo tem sido amplamente utilizado para estudos das alterações histológicas, disfunções respiratórias, complicações circulatórias, aspectos da fibrose, inclusive para o teste de drogas auxiliares no tratamento da cirrose (HINZ et al., 1997; LUO; ABRAMS; FALLON, 1998; LUK et al., 2007; ASSIMAKOPOULOS; VAGIANOS, 2009; LEE et al., 2011; FERRARI, 2012; KIM et al., 2013)

A indução de cirrose hepática por LBD é tão eficiente quanto a indução pela administração de hepatotoxinas, com vantagem em relação ao tempo de indução (CHANG et al., 2005; MARQUES et al., 2012). Além disso o manuseio de algumas hepatotoxinas, tal como tetracloreto de carbono, podem ser potencialmente danosas, com risco de indução de tumores hepáticos ao pesquisador (MARQUES et al., 2012).

2.5 CÉLULAS TRONCO E TERAPIA CELULAR

As células-tronco têm sido descritas como células indiferenciadas capazes de se auto-renovar e de se diferenciar, podendo ser encontradas em quase todos tecidos do corpo, tais como a medula óssea, músculo, tecido adiposo, inclusive no fígado (DROSOS; KOLIOS, 2013). Elas podem ser classificadas de acordo com o

seu potencial de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes. As totipotentes são capazes de se diferenciarem em qualquer dos tecidos embrionários e extraembrionários; as pluripotentes são capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma); as multipotentes podem se diferenciar em alguns tipos celulares, já são mais diferenciadas e possuem plasticidade limitada (DROSOS; KOLIOS, 2013).

Células tronco isoladas de vários tecidos tem sido utilizadas para no tratamento de lesões hepáticas, dentre elas as células derivadas de medula óssea (AHMED et al., 2014); membrana amniótica (SANT'ANNA et al., 2011; RICCI et al., 2013), cordão umbilical (LI et al., 2013); líquido amniótico (ZAGOURA et al., 2012) e células de fígado em várias fases do desenvolvimento intrauterino (FIEGEL et al., 2006; BIN et al., 2012).

As células tronco de fígado fetal, apresentam características apropriadas para terapia celular, pois são de fácil isolamento e cultivo, têm potencial de diferenciação em hepatócitos e colangiócitos, representando atualmente a melhor opção para terapia celular em disfunções hepáticas (SEMERARO et al., 2013).

Células tronco derivadas de fígado fetal humano, foram utilizadas no tratamento de doenças hepáticas congênitas. Estas células quando infundidas em pacientes humanos, portadores da síndrome de Crigler-Najjare ou atresia biliar, promoveu uma melhora da função hepática em ambos, de acordo com a análise dos níveis bioquímicos séricos (KHAN et al., 2008). Quando aplicadas em pacientes, portadores cirrose hepática avançada, houve melhora nos parâmetros clínicos e bioquímicos, com restauração da função hepática, sem a necessidade de imunossupressão dos pacientes (KHAN et al., 2010).

As células isoladas de fígado embrionário de rato com 14 dias de gestação foram capazes de repopular 24% da massa do fígado de animais submetidos a hepatectomia parcial de dois terços do órgão (OERTEL et al., 2008). Outros estudos demonstram que a maior parte da população de células do fígado fetal são células tronco progenitoras (LIU; LI; DOU, 2011). As células derivadas de fígado fetais de ratos, demonstram boa proliferação após o transplante com capacidade de repovoamento do fígado de ratos adultos (OERTEL et al., 2008), sendo capazes de regenerar tanto ductos biliares quanto hepatócitos (BIN et al., 2012). No tratamento de cirrose em ratos induzidos por CCL4, estas células demonstraram capacidade de reduzir significativamente a expressão de fatores envolvidos na ativação das CEHs,

diminuindo conseqüentemente a fibrogênese (BIN et al., 2012).

A terapia celular em modelos experimentais, tem o objetivo de oferecer maiores subsídios para possível utilização da terapia em humanos, compreendendo melhor os processos envolvidos no tratamento da doença, possibilitando oferecer maior segurança na aplicação da técnica. Neste sentido a terapia com células tronco em modelos experimentais de tratamento da cirrose pode oferecer resultados bastante relevantes (YAP, 2012; AHMED et al., 2014).

Visto que as células tronco hepáticas de fígado embrionário de ratos já foram testadas isoladamente e apresentaram características ideais para o tratamento de cirrose “in vitro” e “in vivo”, é oportuno testar o efeito destas células no modelo de cirrose por ligadura do ducto biliar. Este modelo já está estabelecido pela literatura, sendo amplamente utilizado, foi escolhido por ser o modelo que mais se assemelha a cirrose por atresia biliar que ocorre principalmente em crianças, sendo a principal causa de transplante de órgão na infância (SANTOS; CARVALHO; BEZERRA, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

A cirrose representa um importante problema de saúde mundial, sendo o transplante de fígado a única opção definitiva de tratamento. Visto que a demanda por transplantes é superior à oferta, há um grande interesse na busca por novas opções terapêuticas. Neste contexto a terapia celular, utilizando células derivadas do fígado fetal poderá ser uma alternativa promissora, uma vez que estas apresentam potencial antifibrótico, antiinflamatório e regenerativo de hepatócitos.

4 HIPÓTESE

A terapia com células tronco derivadas do fígado fetal de ratos com 14,5 dias de gestação, aplicadas ao modelo de cirrose por ligadura do ducto biliar em ratos, poderá promover efeito antifibrótico, antiinflamatório e a regeneração de hepatócitos, proporcionando assim recuperação do órgão.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Testar se a terapia celular realizada com células derivadas do fígado fetal de ratos com 14,5 dias de gestação, possui potencial na redução da fibrose, na modulação dos indicadores bioquímicos hepáticos e na regeneração de hepatócitos, no modelo de indução da cirrose por ligadura do ducto biliar em ratos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo CEUA nº 3248040214.

Foram utilizados 30 ratos (*Ratus norvegicus*) da linhagem Wistar 24 machos e 6 fêmeas, com idade entre dois e três meses pesando de 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em estante ventilada acomodados em caixas de polipropileno forradas com maravalha, em temperatura ambiente (22-24°C) e iluminação claro e escuro em um ciclo de 12 horas, com acesso ilimitado a comida e água, durante todo o período do experimento.

As ratas foram utilizadas apenas para gestação e coletas dos embriões para isolamento dos fígados. Os ratos machos foram divididos em quatro grupos: grupo 1 (G1, n=4) controle Shan, os animais foram mantidos apenas como controle sem nenhum procedimento cirúrgico ou terapia celular; grupo 2 (G2, n=10), onde os animais foram induzidos a cirrose por ligadura do ducto biliar, e recebeu apenas aplicação de solução fisiológica via veia porta hepática; e grupo 3 (G3, n=10) onde os animais foram induzidos a cirrose por ligadura do ducto biliar, e receberam imediatamente após a ligadura uma única aplicação de 1×10^6 de células de fígado fetal com 14,5 dias de gestação.

6.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS

Os fígados dos embriões foram cuidadosamente isolados colocados em placas de Petri e lavados em solução de tampão fosfato (PBS) (NaCl 8,5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,55g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,23g, H_2O destilada 100ml) com antibiótico (penicilina, estreptomicina 2%, SIGMA[®]). A coleta dos fígados dos embriões foi realizada com a utilização de lupa Stereo.

Os fígados embrionários coletados foram lavados em PBS e macerados,

utilizando lâminas de bisturi. Os fragmentos do tecido foram colocados em placas de cultivo celular com meio de cultura DMEM/F12(LGC Biotecnologia) acrescido de 1% de estreptomicina/penicilina e 1 % de glutamina (GIBICO) e foram incubados em estufa a 37° C e 5% de CO₂ por 24 horas.

Após a adesão celular, as células foram submetidas à dissociação enzimática com tripsina, (TRYPLE), centrifugadas e novamente colocadas em cultivo em condições idênticas de cultivo. Após 48 horas da cultura primária ou ao atingir 80% de confluência, foram novamente dissociadas enzimaticamente e congeladas em meio de congelamento (DMSO 10% em SFB).

6.2.1 Morfologia Celular e Microscopia Eletrônica de Varredura

A expansão e a morfologia das células foram acompanhadas por em microscopia de luz invertida (JENOPTIK (IVU 7000)). As células também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, para esta técnica, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%. Em seguida foram lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70% a 100%). Foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente o material foi colocado em um suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Os resultados foram observados utilizando o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

6.2.2 Caracterização Celular por Citometria de Fluxo

As propriedades imunofenotípicas das células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando ciometometro FACSCalibur (Becton, Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com anticorpo secundário não específico. Para a análise as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBSA na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1:100) por 30 minutos a 4°C. Os anticorpos utilizados foram PCNA (sc-46, Santa

Cruz Biotechnology), Nestin (sc-33677, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD117 (A4502, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), Citoqueratina 7 (sc-70936, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Citoqueratina 18 (sc-32329, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe). Todas as células foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem (0,1% de BSA) e fixadas em paraformol 2%.

6.2.3 Ensaio de Tumorigenese

Foram utilizados 2 camundongos Balb-c^{nu/nu}, machos (± 20 g), com 40 dias de idade, para avaliação do potencial tumorigênico. Foram aplicadas 1×10^7 de células no tecido subcutâneo da região dorsal do animal. Os animais foram observados por 6 semanas. Após este período, os animais foram eutanasiados e os órgãos coletados para análise histológica.

6.3 LIGADURA DO DUCTO BILIAR E TERAPIA CELULAR

Para a indução da cirrose o procedimento cirúrgico de ligadura do ducto biliar (LBD) foi realizado segundo método estabelecido por Kountouras et al., 1984. Inicialmente os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com cloridrato de cetamina 10%, na dose de 30 mg/kg e xilazina 2% 0,5 mg/kg.

A cirurgia de LBD, iniciou se com laparotomia mediana estendendo-se por aproximadamente 4 cm, a partir do apêndice xifóide. Após a localização do ducto biliar, este foi ligado nas duas extremidades, na junção dos ductos biliares e na segunda na entrada dos ductos pancreáticos, seccionado entre elas. Neste momento foi aplicado solução fisiológica pela veia porta hepática nos animais do grupo 2 (G2). Utilizando o mesmo acesso, foram aplicadas 1×10^6 células derivadas do fígado embrionário de ratos com 14,5 dias, suspensas em solução fisiológica, foram aplicadas nos animais do grupo 3 (G3). Reposicionado o fígado e alças intestinais, foi feita a sutura da musculatura abdominal e da pele em 2 planos com sutura contínua utilizando fio nylon. Após a cirurgia todos os animais receberam aplicação de antibiótico (enrofloxacina 2,5%), na dose de 5mg/kg por via subcutânea

(MORRIS,1995).

6.3.1 Eutanásia

Após 6 semanas da cirurgia, término do período experimental, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico segundo método descrito por, Close et al. (1996). A confirmação da eutanásia se deu pela perda do reflexo do globo ocular, ausência das frequências cardíaca e respiratória.

6.3.2 Análise Histopatológica do Fígado

Seis semanas da cirurgia, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico segundo método descrito por Close et al., 1996. Uma porção dos lobos medial e caudado dos fígados foram coletados e fragmentados em tamanhos 5 mm aproximadamente, colocadas em solução Paraformol 4%, permanecendo por 48 horas para fixação. Em seguida o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, posteriormente e emblocados em parafina. Foram feitos cortes de 5 μ m, desparafinizados e corados para Hematoxilina-Eosina e Picrossirus.

6.3.3 Graduação e Estadiamento da Fibrose/Cirrose

Para a análise de graduação e estadiamento, foram adotados os parâmetros estabelecidos por Knodell et al.(1981) e modificados por (Ishak et al. (1995). Neste trabalho graduação da fibrose/cirrose hepática foi realizada com base no índice de atividade histológica (IAH), que classifica as lesões hepáticas de acordo com fatores relacionados a necrose e inflamação tecidual, estabelecendo-se um escore final que varia de 1 a 18. Para a análise do material foram utilizadas lâminas coradas por hematoxilina-eosina, analisadas nos aumentos (10, 20x) em microscópio de luz

(Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera (DS-Ri1, Nikon, Tóquio, Japão). Os patologistas que analisaram as lâminas, desconheciam a identificação do animal ou a qual grupo pertencia o material.

6.3.4 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada para os marcadores, actina de músculo liso (α -SMA), citoqueratina 19 (CK19) e PCNA (sc-46, Santa Cruz Biotechnology), específicos para células estreladas hepáticas ativadas e proliferação de ductos, respectivamente. As amostras de fígados, pós cirurgia, foram seccionadas com 5 μ m de espessura e montadas em lâminas silanizadas, desparafinadas e reidratadas. A recuperação de antígeno foi realizada com tampão citrato (1,83 mM de ácido cítrico monoidratado e 8,9 mM de citrato de sódio tribásico anidro, pH 6,0) em forno microondas por 4 vezes de cinco minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi com 3% de peróxido de hidrogênio em água, por uma hora no escuro. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com 2% de albumina sérica bovina (BSA) em solução tampão de tris (TBS – 2,0 mM de Trizma base e 1,36 mM de cloreto de sódio, pH 7,5) por uma hora seguido de incubação com os anticorpos anti- α -SMA (1:500), anti-CK19 (1:100) e PCNA (1:100) em câmara úmida, por 16 horas, a 4° C. Os anticorpos primários foram detectados com kit Dako Advance HRP, as reações reveladas com DAB e contra-coradas com hematoxilina. Os cortes controle foram incubados com ausência de anticorpos primários. Entre cada passo, as lâminas foram lavadas, três vezes de cinco minutos, com TBS adicionado de 1% de BSA. As reações foram visualizadas em microscópio Zeiss Axioplan 2 microscópio e fotodocumentadas com a câmera AxioCam HRc.

6.3.5 Quantificação de Colágeno Interlobular

Para estimativa do colágeno interlobular nas amostras dos animais após a cirurgia e terapia celular, foi utilizada a coloração de picrosirius. Para tanto, foram adquiridas para cada lâmina 25 imagens no aumento de 20x, em microscópio LSM

510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). As imagens foram então analisadas utilizando o plugin “MRI fibrosis tool” para o software Image J. Brevemente, o plugin faz uma deconvolução nas imagens, separando a marcação por Sirius Red em um novo canal, a seguir ele conta a quantidade de pixels nesse canal em relação à área total da imagem, apresentando os valores em porcentagem de colágeno em relação à área total analisada. Os dados foram analisados pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = General Linear Models) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais e erro padrão.

7 RESULTADOS

Para estabelecimento da cirrose hepática em ratos foi utilizado o modelo de ligadura do ducto biliar. Trata-se um modelo já estabelecido e amplamente utilizado, caracterizado por induzir progressivamente a fibrose levando finalmente a cirrose. Tal modelo vem sendo utilizado em estudos dos mecanismos envolvidos desde a fibrogênese até a cirrose, além de ser ainda utilizado como modelo para testes de novas opções terapêuticas. Como terapia para a regressão da cirrose utilizamos células derivadas de fígados embrionários de ratos com 14,5 dias de gestação.

Os resultados obtidos com os citados modelo e células, foram submetidos a análises qualitativas, quantitativas e semiquantitativas, utilizando cortes histológicos, corados com colorações de HE e picrosirus para verificação da deposição de colágeno como lesões hepáticas, necroinflamação propostas por Knodel e adaptadas por Isak (KNODELL et al., 1981; ISHAK et al., 1995). Os resultados obtidos com reações de imunohistoquímica utilizando anticorpos anti- α SMA e anti-CK19 subsidiaram a análise da ativação das células estreladas hepáticas e proliferação de ductos, respectivamente.

De modo geral, após o período de seis semanas, o grupo operado no qual não foi realizada terapia celular, atingiu nível elevado de fibrose, apresentando desorganização do parênquima hepático, com nódulos de regeneração fibroticos característicos da cirrose hepática. Ainda que o grupo tratado com terapia celular apresentasse acentuada deposição de fibrose, as análises quantitativas e semiquantitativas demonstraram que esta ocorreu de maneira menos intensa quando comparada ao grupo controle cirúrgico não tratado.

7.1 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DO FÍGADO EMBRIONÁRIO

Aos 14,5 dias de gestação as ratas gestantes foram eutanasiadas e os embriões recuperados. Estes já apresentavam alguns órgãos externos e internos em desenvolvimento, sendo possível visualizar o coração, fígado com

lobos hepáticos distintos mas ainda imaturos, os intestinos herniados, os membros torácicos mais desenvolvidos em forma de pá, enquanto os membros pélvicos apresentam apenas os brotos. Os embriões mediam entre 11 e 13 mm de tamanho, e foram manipulados com auxílio de lupa. Cada útero continha de cinco a sete embriões, os quais por sua vez foram separados dos seus anexos fetais, prosseguindo assim a coleta dos fígados (Figura 1).

Figura 1 - Fotomicrografia do embrião e do fígado embrionário do rato com 14,5 dias de gestação

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: [A]-Embrião apresentando órgãos externos e internos em desenvolvimento, em destaque coração (seta), fígado (arco) onde já é possível visualizar lobos distintos; [B] - Fígado embrionário isolado, apresentando 4 lobos distintos.

7.1.1 Cultivo e Morfologia Celular

Os fígados após isolamento, foram macerados e colocados em cultivo. As células tiveram boa aderência à placa de cultivo, formando monocamada celular após 24 horas de cultura dos explantes. As células apresentaram crescimento e viabilidade celular adequados mesmo após o processo de criopreservação. As células demonstraram boa proliferação, atingindo confluência de oitenta por cento em 48 horas, e permaneceram viáveis durante as quatro primeiras passagens (período testado).

A morfologia das células foi melhor visualizada mediante a utilização da

técnica de microscopia eletrônica de varredura, onde as células apresentaram características hepáticas, demonstrando formatos arredondados ou poligonais, citoplasma abundante e núcleos arredondados, com um ou dois nucléolos, característicos de hepatócitos (Figura 2).

Figura 2 - Fotomicrografia de células derivadas de fígado embrionário de rato com 14,5 dias de gestação

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Fotomicrografia de células derivadas de fígado embrionário de rato com 14,5 dias de gestação. [A] mostra cultivo primário após 24 horas, notar o explante (e) liberando células (seta); [B] células em quarta passagem demonstrando confluência de 80% da placa após 48 horas; [C] após o teste de criopreservação, demonstrando que células que mantiveram a mesma proliferação mantendo a morfologia. Em D, E, F microscopia eletrônica de varredura das células; [D, E] mostra células com formatos arredondados ou poligonais, citoplasma abundante núcleo centralizado, [F] apresenta núcleo celular com dois nucléolos (seta). Aumento [A] 4X, [B] 10x e [C] 20x.

7.1.2 Caracterização Molecular das Células Realizada pela Técnica de Citometria de Fluxo

Para caracterização molecular das células, foram avaliadas por citometria de fluxo, a presença de anticorpos CD117, CD44 e Nestin, os quais são utilizados para células progenitoras hepáticas. O anticorpo PCNA foi escolhido como marcador para proliferação celular, bem como os anticorpos CK7 e CK18, são utilizados para identificar colangiócitos e hepatoblastos

respectivamente. Os anticorpos com maior expressão foram CD117 (c-kit, 28,7%), CD44 (18,8%) e PCNA (15,7%), no entanto os anticorpos CK7 (7,83%), Nestin (6,75%) e CK18 (2,94%) também foram expressos. Estes dados sugerem como resultado, uma população heterogênea de células em proliferação com maior porcentagem de células progenitoras indiferenciadas no pool celular, sendo que células precursoras de hepatócitos e de células biliares, diferenciadas também estão presentes (Figura 3).

Figura 3 - Histograma de imunofenotipagem das células de fígado embrionário de ratos com 14.5 dias de gestação por citometria de fluxo

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Os gráficos representam a expressão do controle por linhas (azuis) em contraste com a expressão dos anticorpos específicos marcados em rosa.

7.1.3 Ensaio de Tumorigenese

Após seis semanas da aplicação das células derivadas do fígado embrionário de rato 14,5 dias de gestação, observou-se que estas não induziram a formação tumoral. Foram avaliadas características macro e microscópicas no local da aplicação e nos principais órgãos, coração, pulmão,

baço, fígado e rins, os quais não apresentaram nenhuma formação tumoral mantendo as características histológicas normais para cada tecido. O resultados negativos do ensaio de tumorigenese significam que a aplicação das referidas células não risco de tumor podendo oferecer maior segurança à terapia (Figura 4).

Figura 4 - Ensaio de tumorigenese no camundongo nude

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Em [A] evidencia-se o local da aplicação subcutânea das células no membro pélvico esquerdo. [B]-[F] apresenta histologia normal dos órgãos analisados. [B] baço, [C] coração, [D] fígado, [E] pulmão (a) alvéolo, (bl) bronquíolo; [F] rim, observar (halo) glomérulo, (tp) túbulo contorcido proximal, (td) túbulo contorcido distal. Barra (A) um cm.

7.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE CIRROSE

O procedimento cirúrgico para ligadura do ducto biliar (LDB) modelo bem estabelecido, sendo possível sua repetição nesta pesquisa (Figura 5). Após a LDB ambos os grupos (G2 e G3) apresentaram piloereção, pouca responsividade a manipulação e ainda uma notável redução de movimentos no período experimental. Durante o período de 5 dias após a LDB os animais apresentaram uma pequena perda de peso corporal. Isto significa que a técnica foi efetiva, vistos os primeiros sinais de comprometimento responsivos ao

procedimento. Após esse período os animais do grupo G2 apresentaram maior aumento de volume abdominal e maior intensidade de icterícia, que também foi observado nos animais do grupo G2 em menor intensidade. Os do grupo G1 permaneceram sem alterações físicas ou comportamentais.

Durante o período experimental de seis semanas, todos os quatro animais do grupo G1 (controle shan) sobreviveram. Já entre os animais operados, sete destes do grupo G3 (cirúrgico tratado) e apenas cinco animais grupo G2 (controle cirúrgico) sobreviveram até o final do experimento. O índice de sobrevida dos animais tratados (G3), foi 20% maior em relação ao grupo cirúrgico não tratado (G2).

Figura 5 - Fotodocumentação macroscópica da cirurgia de LDB

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Em [A] o esquema mostra uma ilustração do procedimento de LDB; Em [B] a localização do ducto biliar comum (seta); Em [C] ducto ligado em dois pontos para posterior secção entre eles; [D] mostra o ducto seccionado (seta); [E] apresenta a aplicação das células pela veia porta hepática; Em [F] mostra o aspecto final da cirurgia com o abdômen já suturado em dois planos de sutura contínua.

7.2.1 Avaliação Clínica e Avaliação Anatômica Macroscópica dos Animais

O modelo experimental escolhido foi eficiente em produzir cirrose, apresentando resultados que condizem com o modelo de cirrose biliar secundária estabelecido pela literatura (KOUNTOURAS; BILLING; SCHEUER,

1984).

Os sinais clínicos bem como as alterações macroscópicas dos grupos experimentais foram observados e comparados com o grupo G1 (controle Shan). O grupo G2 (controle cirúrgico), apresentou como sinal mais evidente, o aumento do volume abdominal, outros achados foram, intensa icterícia hepatomegalia, esplenomegalia, nódulos de regeneração hepáticos, acúmulo de líquido biliar com hiperplasia do ducto biliar, isquemia tecidual, pontos hemorrágicos, também foram achados comuns no grupo G2. No grupo G3 (cirúrgico tratado), as alterações se mostraram macroscopicamente menos intensas, que no grupo G2, demonstrando efeito benéfico por parte do tratamento.

Os sinais macroscópicos apresentados pelo grupo G1 são típicos do animal normal sem alterações estruturais ou fisiológicas, sendo esta a base para a comparação, o abdômen em conformação normal, fígado apresentando coloração avermelhada escuro, disposição normal na cavidade abdominal, com bordos finos, textura friável. Já os animais dos grupos operados, G2 apresentam características distintas tais como, fígados apresentando uma coloração amarelada, textura firme e nodular, bordos arredondados, no grupo G3 a coloração do fígado é mais próxima do órgão dos animais controle assim como a textura, vale ressaltar que ambos os grupos tanto G2 quanto G3 apresentam características estruturais e fisiológicas típicas na cirrose supracitadas, como será apresentado abaixo na (Figura 6).

Figura 6 - Fotodocumentação macroscópica dos fígados dos diferentes grupos experimentais

Fonte: (PEREIRA, 2016).

Legenda: Em [A] animal G1 mostra conformação abdominal normal; [B] disposição normal de fígado; Em [C] fígado normal isolado do animal G1; Em [D] animal G2 apresentando icterícia, aumento de volume abdominal; Em [E] hepatomegalia e espleomegalia; Em [F] fígado isolado do animal G2, apresentando nódulos de regeneração(setas), icterícia severa; [G,H,I] mostra grupo G3, em [G] apresentando mucosa com icterícia menos intensa que G2, Em [H] fígado mantém dimensões do parênquima mais próximas do normal, com intenso acúmulo de bÍlis, [I] Órgão isolado, mostra maior proximidade do controle em coloração e aspecto da superfície do Órgão menos nodular.

7.2.2 Análise Histopatológica

A análise histológica do fígado dos animais do grupo shan (GS), apresentou características morfológicas normais, espaços porta preservados, hepatócitos dispostos em camadas, organização dos sinusóides em sentido a uma veia central, de acordo a arquitetura normal do parênquima hepático. O grupo G2, apresentou desorganização do parênquima, proliferação de ductos, necrose de hepatócitos, presença de infiltrado inflamatório e deposição massiva de matriz extracelular (fibras de colágeno), característicos na cirrose biliar secundária. O grupo G3 também apontou presença de infiltrado inflamatório e proliferação de ducto entretanto menos intensa que o grupo G2 (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias do parênquima hepático

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Em [A] grupo G1 (controle Shan), estrutura normal do parênquima, espaço porta preservado mostrando ducto biliar, artéria hepática, veia porta; [B] grupo G2 (controle cirúrgico) – Mostra desorganização do parênquima hepático, necrose de hepatócitos, infiltrado inflamatório, deposição excessiva de fibras de colágeno formando septos de fibrose. [C] Mostra grupo G3 (cirúrgico tratado), infiltrado inflamatório, proliferação de ducto e desorganização parenquimal, menos intensa em comparação ao G2. Coloração de hematoxilina eosina (A) e masson (B), (Barra 100 µm).

7.2.3 Graduação e Estadiamento da Fibrose/Cirrose

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, sendo estes, Necrose piecemeal ou Hepatite de interface, Necrose confluyente, Necrose lítica focal, Apoptose e inflamação focal e Inflamação portal. Os grupos foram avaliados de acordo com o grau de lesão apresentados recebendo uma pontuação numérica de escore.

Todas as amostras do grupo G1 (controle Shan), exibiram características histológicas normais para o tecido analisado. Considerando-se os parâmetros utilizados na classificação das lesões a média dos escores correspondentes as amostras são 0.

Os amostras do grupo G2 (não tratado) apresentaram um grau de lesão sensivelmente maior que os animais do grupo G3 (tratado), a média dos escores dos grupos foi 7,7, contra 6,6 respectivamente (Figura 8).

Todos os animais apresentaram hiperplasia acentuada de ductos biliares no estroma de tecido conjuntivo dos espaços porta, bem como na região periportal em decorrência da obstrução induzida experimentalmente por meio de ligadura do ducto biliar, dados observados por um dos patologistas que analisou o material, mas que será detalhado em outro tópico, pois este achado não consta na avaliação das tabelas de classificação propostas.

Figura 8 – Graduação e estadiamento da fibrose /cirrose os grupos sham (G1), controle cirurgia (G2) e terapia celular (G3)

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: O grafico mostra sensível diferença entre o grau de necroinflamação entre os grupos G2 e G3

7.2.4 Imunohistoquímica

O potencial do tratamento em atenuar a proliferação de ductos foi avaliado, utilizando anticorpo anti-CK19. A expressão deste marcador foi mais intensa nas áreas periportais, sendo maior a proliferação nos animais do grupo G2 (não tratado) (Figura 9).

Figura 9 – Fotomicrografias das reações de imunohistoquímica para os anticorpos anti-CK19, anti- α -SMA e anti-PCNA

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: Demonstrando a expressão dos marcadores, PCNA, CK 19 e α SMA em comparação entre os grupos G1 (A, D, G), G2 (B, E, H) e G3 (C, F, I), representando a análise dos grupos para intensidade de expressão dos marcadores. O grupo G2 dois teve maior intensidade de marcação para CK19 e α SMA, ao passo que o grupo G3 teve maior marcação para PCNA. Aumento de 20x.

Para avaliar a ativação de células estreladas hepáticas, utilizou-se o anticorpo anti- α -SMA, que em condições normais marca apenas a região da parede dos vasos, sem que seja observada expressão significativa em outros locais. Nos animais do grupo G2 foi observado, maior expressão do anticorpo α -SMA sobre o parenquima. A marcação de α -SMA parenquimal foi menos intensa no grupo G3 (tratado), concentrando-se na região periportal (Figura 9).

O anticorpo anti-PCNA foi utilizado para avaliar a proliferação celular. Houve uma intensa marcação em ambos os grupos, porém os animais do grupo tratado demonstraram maior presença de imunorreação em relação ao grupo não tratado, demonstrando que apesar da proliferação celular comum em casos de injúria hepática, nos animais do grupo G2 essa proliferação acontecia mais intensamente, o que sugere o potencial regenerativo do tratamento (Figura 9).

7.2.5 Quantificação de Colágeno Interlobular

Os resultados demonstraram diferença significativa ($P > 0,001$) entre os grupos, apresentando maior deposição de colágeno interlobular para os animais do grupo G2 ($19,85\% \pm 0,46$), em relação aos animais dos grupos G1 ($4,74\% \pm 0,46$) e G3 ($13,77\% \pm 0,43$). Estes dados demonstram que o efeito do procedimento de ligadura do ducto, com maior deposição de fibrose foi mais severo nos animais do grupo G2 (não tratados) (Figuras 10 e 11).

Os resultados obtidos quanto a deposição de colágeno Interlobular, significam que os grupos tiveram reações diferentes quanto ao estímulo causado pelo procedimento de ligadura do ducto biliar, com consequentemente aumento da deposição do colágeno Interlobular no grupo não tratado G2. (Figura 11).

Figura 10 – Deposição de colágeno nos fígados dos diferentes grupos estudados

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: demonstração da deposição de colágeno em comparação entre os grupos G1 (A-C), G2 (D-F) e G3 (G-I), evidenciando maior deposição no grupo G2, (C, F, I) representando exclusivamente a deposição de colágeno parenquimal. Coloração de picrosirius, efeito do contraste software Image J, aumento de 20x.

Figura 11 - Quantificação de colágeno interlobular entre os grupos sham (G1), controle cirurgia (G2) e terapia celular (G3)

Fonte: (PEREIRA, 2016)

Legenda: O gráfico demonstra maior deposição de fibrose para o grupo G2 (controle cirurgia) em relação ao grupo G3 (terapia celular). Letras representam significância ($p \leq 0,001$) entre os grupos estudados.

8 DISCUSSÃO

O tratamento com aplicação de células derivadas de fígados embrionários de ratos com 14,5 dias de gestação reduziu significativamente a progressão da fibrose hepática no modelo de cirrose por ligadura do ducto biliar. O tratamento teve um efeito positivo ao diminuir ou atenuar a proliferação de ductos e a ativação de células estreladas hepáticas. Nossos achados corroboram com os trabalhos de outros autores que utilizaram células derivadas de fígado embrionário de ratos em outro modelo de estudo (BIN et al., 2012). A fibrose hepática é fator primordial que inicia uma cascata de eventos que antecedem a cirrose. Conter a progressão da fibrose ou seja, interferir de maneira positiva na sua progressão é o que se poderia esperar do tratamento como um passo importante para evitar um maior comprometimento do órgão, que conseqüentemente leva ao comprometimento de outros órgãos e de outros sistemas, como o sistema vascular por exemplo (BHATIA et al., 2014)

Atenuar a progressão de fibrose, seria extremamente desejável sobretudo enquanto o processo de fibrotico, ainda não tenha evoluído para a cirrose, que de acordo com a definição da Organização Mundial de Saúde, é um processo difuso caracterizado pela fibrose, convertendo a arquitetura hepática normal em nódulos de regeneração durante a injúria crônica (HYTIROGLOU et al., 2012). A fibrose evolui progressivamente até a cirrose caso não ocorra intervenção ou caso a intervenção seja efetiva. A principal medida a ser tomada no caso do diagnóstico da doença crônica é interromper a causa primária, como por exemplo o combate ao vírus no caso da hepatites virais (BERENGUER; SCHUPPAN, 2013). Ainda que estas medidas sejam adotadas, os tratamentos convencionais disponíveis atualmente, tem se mostrado pouco efetivos para conter essa progressão da fibrose, sendo o transplante de órgão ainda o tratamento efetivo em casos avançados (FERREIRA et al., 2015). No caso da terapia celular proposta, os resultados demonstraram que as células foram eficientes em conter parcialmente a progressão da fibrose, mesmo com o estímulo causador das lesões ainda presente, ou seja a colestase causada pela ligadura do ducto biliar. A hipótese

é de que as células atenuaram a progressão da fibrose devido a modulação da ativação das células estreladas hepáticas, principais responsáveis no processo fibrótico. Essa modulação foi quantificada por meio de ensaios de imunohistoquímica, analisando a expressão do marcador de actina de músculo liso (α SMA), sendo este o principal marcador expresso pelas células estreladas após a sua ativação convertendo-se em miofibroblastos. Em relação ao mecanismo exato pelo qual as células derivadas do fígado embrionário, retardam o processo fibrótico atuaram, ainda não foi claramente elucidado, assim como também relataram (SANT'ANNA et al., 2011). Acredita-se que o efeito observado, esteja relacionado com o potencial antiinflamatório e imunomodulador, (BIN et al., 2012), das células utilizadas neste trabalho, inativando ou modulando mecanismos da resposta imune, através de fatores envolvidos na cascata inflamatória, tais como $TGF\beta$ fortemente envolvidas na ativação das células estreladas hepáticas (ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014). A hipótese de que a inativação das células estreladas hepáticas por meio de fatores antiinflamatórios, esteja diretamente relacionada com a diminuição da progressão de fibrose corrobora com os achados de outros autores (JUNG et al., 2009).

A quantificação da expressão do marcador α SMA, representa a intensidade de ativação das células estreladas hepáticas, podendo assim ser um indicador de maior deposição de matriz extra celular (RICCI et al., 2013). A expressão deste marcador foi analisada nos tecidos hepáticos dos animais dos diferentes grupos experimentais mediante a utilização da análise morfológica, demonstrando que houve menor expressão do marcador nos animais do grupo G1 (controle Shan) e G3 (cirúrgico tratado), do que nos animais do grupo G3 (controle cirúrgico). Este dado indica que o tratamento interferiu positivamente diminuindo a ativação das células estreladas hepáticas.

É importante ressaltar que mesmo em um modelo de cirrose no qual o estímulo causador permanece estimulando a fibrogênese, ainda assim a progressão das lesões foi menos acentuada com uso da terapia, demonstrando o efeito significativo antifibrótico. Entretanto outros sinais de melhora deste quadro podem ser ressaltados, tal como o aumento da sobrevivência dos animais do grupo tratado (G3), também observado por (BIN et al., 2012), bem como pela menor intensidade de sinais clínicos, tais como icterícia e ascite,

esplenomegalia hepatomegalia, em relação aos animais do grupo não tratado G2.

O presente trabalho pode ser considerado relevante, uma vez que, os animais foram tratados em momento anterior ao estabelecido do quadro de cirrose, ou seja, as células foram aplicadas imediatamente após a ligadura do ducto biliar. Sendo assim o processo inflamatório, desenvolvido pela lesão causada foi controlado desde o início. Desta forma a terapia seria indicada tanto em casos de cirrose já diagnosticados, quanto naqueles casos diagnosticados antes que o processo cirrótico estivesse estabelecido, podendo deste modo exercer efeito benéfico na progressão da fibrose, durante a doença hepática crônica.

O modelo experimental de cirrose por ligadura do ducto biliar foi escolhido para este trabalho, por ser o que mais se assemelha, aos casos de cirrose biliar secundária que ocorre em consequência da colestase obstrutiva e atresia biliar em humanos (PEREIRA et al., 2010; FICKERT et al., 2014). Este modelo propõe um período de quatro a oito semanas para o estabelecimento do quadro de cirrose, produzindo necroinflamação, fibrose e consequentemente a cirrose semelhante a outros modelos de cirrose induzida pela administração de fármacos hepatológicos, diferindo na questão do tempo de indução que é de 4 a 8 semanas. Sendo assim, este foi considerado o método mais rápido e consistente de indução de cirrose (LEE et al., 2011). A técnica de ligadura do ducto biliar apresenta vantagens sobre outros métodos de indução de cirrose hepática, não apenas em relação ao tempo necessário para indução de fibrose e cirrose, mas também em relação a segurança do procedimento, considerando que os modelos de indução por drogas como tetracloreto de carbono (TCC4), por exemplo (AHMED et al., 2014), pode oferecer risco de tumores hepáticos ao pesquisador (MARQUES et al., 2012).

A avaliação do tratamento utilizou a morfometria com uma de suas principais ferramentas. O método de análise histológica por morfometria é utilizado, para mensurar (quantificar) fibrose em doenças crônicas do fígado (RICCI et al., 2013). Em nosso trabalho utilizando este método tornou possível medir de forma fidedigna a deposição de colágeno nos grupos estudados. Ainda para completar as análises dos resultados, utilizou-se também o estadiamento e graduação da cirrose, sob o método proposto por Knodel e

optado por Ishak et al. (1995). Este método de avaliação semiquantitativa, analisa o estadiamento e graduação da fibrose/cirrose, em cortes histológicos de tecido hepático proveniente de biopsia hepática, amplamente utilizado para mensuração em modelos. Para a análise morfométrica quantitativa citado, utilizando coloração de picrosirus foi possível verificar que no grupo G3 dos animais (tratados) houve menor grau de deposição de fibrose. Complementando estes resultados sob a avaliação semiquantitativa citada, foi possível verificar que os animais do grupo G2 (não tratados), o escore de necroinflamação foi maior, segundo a avaliação de patologistas experientes, em testes cegos onde os quais desconheciam a identificação dos grupos analisados. Utilizando os dois métodos em associação, obteve se maior grau de acurácia nos resultados, confirmando o potencial antiinflamatório do tratamento de lesões hepáticas, como observou Bin et al. (2012) em seus trabalhos.

O método de imunohistoquímica foi o teste utilizado para análise da ativação das células estreladas, por intensidade de expressão do marcador de actina de musculo liso α SMA (LE COUTEUR et al., 2008). Analisou se e quantificou se a expressão desse marcador por morfometria nos grupos experimentais. Os resultados quantitativos que nos permite afirmar que a ativação de células estreladas foi menos intensa no grupo tratado confirmando o potencial antiinflamatório do tratamento. Da mesma forma avaliou se a proliferação de ductos biliares, pela expressão do marcador CK 19, visto que este é um marcador específico para epitélio de células biliares (RICCI et al., 2013). Após a análise verificou se que os animais do grupo G3, (tratado), apresentaram menores níveis de CK19, quando comparados aos do grupo G2 (não tratados).

A proliferação celular pode ser observada no processo de regeneração hepática, e este fato pode ser mensurado pela expressão do marcador PCNA, em tecido hepático normal, o qual se apresenta minimamente expresso ou até mesmo ausente (KANG; KIM; AHN, 2014).

O PCNA foi o marcador mais expresso nos animais dos grupos submetidos a cirurgia de ligadura do ducto biliar, indicando que os animais de ambos os grupos estavam em processo de regeneração tecidual em virtude das lesões. Entretanto como nos animais tratados houve uma maior expressão

desse marcador, os resultados referentes a morfometria e à quantificação demonstraram maior expressão deste marcador nos animais do grupo G3 em relação ao grupo G2, confirmando a hipótese de maior estímulo a regeneração tecidual, considerando o potencial regenerativo das células (PAYUSHINA et al., 2013; PATIL et al., 2014)

As células derivadas do fígado embrionário de ratos com 14,5 dias de gestação demonstraram as características esperadas para terapia, uma vez que tais células apresentaram marcadores de células progenitoras hepáticas tais como CD 44, CD 117(c-kit), Nestin (OERTEL, 2011; BIN et al., 2012; EXPERIMENTAL, 2013; GONGH et al., 2013), assim como CK 18, marcador de hepatoblastos precursores de hepatócitos (FIEGEL et al., 2006; SEMERARO et al., 2012; HABEEB et al., 2015). Quanto ao marcador de colangiocitos, CK 7 (CANTZ; MANNS; OTT, 2008; OERTEL et al., 2008; GONGH et al., 2013), este também foi expresso, confirmando assim o seu bipotencial de diferenciação com sugerem os trabalhos de (OERTEL, 2011; BIN et al., 2012; YOVCHEV et al., 2014).

Alguns autores evidenciaram o aspecto bipotencial das células derivadas de fígado embrionário de ratos (LIU; LI; DOU, 2011; OERTEL, 2011). Os autores relataram ainda que aos 12 dias, a maior parte das células presentes no então broto hepático são células hematopoiéticas (MANSUROGLU et al., 2009). Outros pesquisadores observaram que a partir do decimo sexto dia, as células já estão praticamente diferenciadas (OERTEL et al., 2006; BIN et al., 2012)

Entre 14º e 16º dias de gestação as células dos fígados embrionários de ratos tem a maior concentração de células progenitoras, e o maior potencial de diferenciação, em contraste com a menor proporção de células hematopoiéticas. Nossos achados corroboram com Oertel al.(2006), uma vez as células apresentam características fenotípicas e morfológicas de progenitoras hepáticas, sendo portanto apropriadas para a terapia celular aplicadas aos casos de fibrose e cirrose hepática.

9 CONCLUSÕES

Após a análise completa dos dados aqui apresentados e concluiu-se que a aplicação de células derivadas de fígados embrionários de ratos com 14,5 dias de gestação, contribui para modulação da deposição da fibrose, atua no processo como antiinflamatório, melhora a regeneração de células hepáticas, consequentemente retardando assim a evolução do quadro para o estabelecimento da cirrose hepática, no modelo de LDB. O referido tratamento poderia também exercer efeito benéfico preventivo das complicações em doenças hepáticas crônicas que levam à cirrose.

REFERÊNCIAS

ABUL, H.; MATHEW, T. C.; DASHTI, H. M.; AL-BADER, A. Level of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Uric Acid in Thioacetamide-Induced Cirrhotic Rats. **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C**, v. 31, n. 2, p. 66–71, abr. 2002.

AHMED, S. K.; MOHAMMED, S. A.; KHALAF, G.; FIKRY, H. Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of CCL 4 Induced Liver Fibrosis in Albino Rats: A Histological and Immunohistochemical Study. **International Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 87–97, 30 nov. 2014.

ALLER, M.-A. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. **World Journal of Hepatology**, v. 4, n. 7, p. 199, 2012.

ALQAHTANI, S. a; LARSON, A. M. Adult liver transplantation in the USA. **Current opinion in gastroenterology**, v. 27, n. 3, p. 240–247, 2011.

ANTHONY, P. P.; ISHAK, K. G.; NAYAK, N. C.; POULSEN, H. E.; SCHEUER, P. J.; SOBIN, L. H. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 4, p. 521–40, 1977.

ASSIMAKOPOULOS, S. F.; VAGIANOS, C. E. Bile duct ligation in rats: A reliable model of hepatorenal syndrome? **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 1, p. 121–123, 2009.

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

BEGUM, S.; JOSHI, M.; EK, M.; HOLGERSSON, J.; KLEMAN, M. I.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Characterization and engraftment of long-term serum-free human fetal liver cell cultures. **Cytotherapy**, v. 12, n. 2, p. 201–11, 2010.

BERARDIS, S.; SATTWIK, P. D.; NAJIMI, M.; SOKAL, E. M. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis : Current situation and future prospects. v. 21, n. 3, p. 742–758, 2015.

BERENGUER, M.; SCHUPPAN, D. Progression of liver fibrosis in post-transplant hepatitis C: Mechanisms, assessment and treatment. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 5, p. 1028–1041, maio 2013.

BHATIA, S. N.; UNDERHILL, G. H.; ZARET, K. S.; FOX, I. J. Cell and tissue engineering for liver disease. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 245, p. 245sr2-245sr2, 16 jul. 2014.

BIN, W. T.; MA, L. M.; XU, Q.; SHI, X. L. Embryonic hepatocyte transplantation for hepatic cirrhosis: Efficacy and mechanism of action. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 4, p. 309–322, 2012.

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D.-C.; ROUDOT-THORAVALL, F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **Journal of hepatology**, v. 58, n. 3, p. 593–608, 2013.

BONA, S.; FILIPPIN, L. I.; DI NASO, F. C.; DE DAVID, C.; VALIATTI, B.; ISOPPO SCHAUN, M.; XAVIER, R. M.; MARRONI, N. P. Effect of Antioxidant Treatment on Fibrogenesis in Rats with Carbon Tetrachloride-Induced Cirrhosis. **ISRN Gastroenterology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ANÁLISE DE SITUAÇÃO DE SAÚDE. **Uma análise da situação de saúde e a vigilância da saúde da mulher**. [s.l.: s.n.]

BRASIL, M. D. S. S. D. V. E. S. Mortalidade do adulto no Brasil: taxas de mortalidade segundo o sexo, as causas e as regiões, 2010. **Secretaria de Vigilância em Saúde/MS**, p. 185–208, 2010.

CANTZ, T.; MANNS, M. P.; OTT, M. Stem cells in liver regeneration and therapy. **Cell and Tissue Research**, v. 331, n. 1, p. 271–282, 2008.

CHANG, M.-L.; YEH, C.-T.; CHANG, P.-Y.; CHEN, J.-C. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4167–72, 21 jul. 2005.

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. 1441–7, maio 2012.

CHINNICI, C. M.; TIMONERI, F.; AMICO, G.; PIETROSI, G.; VIZZINI, G.; SPADA, M.; PAGANO, D.; GRIDELLI, B.; CONALDI, P. G. Characterization of Liver-Specific Functions of Human Fetal Hepatocytes in Culture. **Cell transplantation**, v. 24, n. 6, p. 1139–53, 2015.

DROSOS, I.; KOLIOS, G. Stem cells in liver regeneration and their potential clinical applications. **Stem cell reviews**, v. 9, n. 5, p. 668–84, 2013.

DUVAL, F.; MORENO-CUEVAS, J. E.; GONZÁLEZ-GARZA, M. T.; MALDONADO-BERNAL, C.; CRUZ-VEGA, D. E. Liver fibrosis and mechanisms of the protective action of medicinal plants targeting inflammation and the immune response. **International Journal of Inflammation**, v. 2015, 2015.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe C: Anatomie, Histologie, Embryologie**, v. 2, n. 1, p. 11–45, mar. 1973.

FERREIRA, R.; JÚNIOR, M.; SALVALAGGIO, P.; REZENDE, M. B. De; EVANGELISTA, A. S.; GUARDIA, B. Della; EDUARDO, C.; MATIELO, L.; NEVES, D. B.; PANDULLO, F. L.; EDUARDO, G.; FELGA, G.; ANDRÉ, J.;

CURVELO, L. A.; GUSTAVO, L.; DIAZ, G.; RUSI, M. B.; VIVEIROS, M. D. M.; ALMEIDA, M. D. De; PEDROSO, P. T.; ROCCO, R. A.; PAIVA, S.; FILHO, M. Liver transplantation : history , outcomes and perspectives. v. 13, n. 11, p. 149–152, 2015.

FIEGEL, H. C.; BRUNS, H.; LIOZNOV, M. V; KLUTH, D. Cell Growth and Differentiation of Different Hepatic Cells Isolated From Fetal Rat Liver. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 1, 2006.

FITZPATRICK, E.; MITRY, R. R.; DHAWAN, A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. **Journal of Internal Medicine**, v. 266, n. 4, p. 339–357, out. 2009.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 1, n. 2, p. 98–105, dez. 2004.

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

FRIEDMAN, S. L.; SHEPPARD, D.; DUFFIELD, J. S.; VIOLETTE, S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 167, p. 167sr1, 2013.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. **Cmaj**, v. 172, n. 3, p. 367–379, 2005.

GONGH, P.; WANG, Y.; ZHANG, J.; WANG, Z. Differential hepatic stem cell proliferation and differentiation after partial hepatectomy in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1005–1010, 2013.

HABEEB, M. A.; VISHWAKARMA, S. K.; BARDIA, A.; KHAN, A. A. Hepatic stem cells: A viable approach for the treatment of liver cirrhosis. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 5, p. 859–65, 2015.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Anatomy and embryology of the laboratory rat. **Anatomy and Embryology**, p. 287–297, 1986.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 425–456, 28 fev. 2011.

HINZ, S.; FRANKE, H.; MACHNIK, G.; MÜLLER, A.; DARGEL, R. Histological and biochemical changes induced by total bile duct ligation in the rat. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie**, v. 49, n. 3–4, p. 281–288, 1997.

HYTIROGLOU, P.; SNOVER, D. C.; ALVES, V.; BALABAUD, C.; BHATHAL, P. S.; BIOULAC-SAGE, P.; CRAWFORD, J. M.; DHILLON, A. P.; FERRELL, L.; GUIDO, M.; NAKANUMA, Y.; PARADIS, V.; QUAGLIA, A.; THEISE, N. D.; THUNG, S. N.; TSUI, W. M. S.; VAN LEEUWEN, D. J. Beyond “cirrhosis”. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 137, n. 1, p. 5–9, 2012.

ISHAK, K.; BAPTISTA, a; BIANCHI, L.; CALLEA, F.; DE GROOTE, J.; GUDAT, F.; DENK, H.; DESMET, V.; KORB, G.; MACSWEEN, R. N. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **Journal of hepatology**, v. 22, n. 6, p. 696–699, 1995.

JIMÉNEZ, W.; CLÁRIA, J.; ARROYO, V.; RODÉS, J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 7, n. 1, p. 90–7, 1992.

JUNG, K. S.; KIM, S. U. Clinical applications of transient elastography. **Clinical and Molecular Hepatology**, v. 18, n. 2, p. 163, 2012.

KANG, W.; KIM, S. U.; AHN, S. H. Non-invasive prediction of forthcoming cirrhosis-related complications. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 10, p. 2613–2623, 2014.

KHAN, A. A.; PARVEEN, N.; MAHABOOB, V. S.; RAJENDRAPRASAD, A.; RAVINDRAPRAKASH, H. R.; VENKATESWARLU, J.; RAO, P.; PANDE, G.; LAKSHMI NARUSU, M.; KHAJA, M. N.; PRAMILA, R.; HABEEB, A.; HABIBULLAH, C. M. Treatment of Crigler-Najjar Syndrome Type 1 by Hepatic Progenitor Cell Transplantation: A Simple Procedure for Management of Hyperbilirubinemia. **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 4, p. 1148–1150, 2008.

KHAN, A. A.; SHAIK, M. V.; PARVEEN, N.; RAJENDRAPRASAD, A.; ALEEM, M. A.; AEJAZ, M.; SRINIVAS, G.; AVINASH, T.; TIWARI, S. K.; KUMARESAN, K.; VENKATESWARLU, J.; PANDE, G.; HABIBULLAH, C., M. Human fetal liver derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end stage decompensated liver cirrhosis. **Cell Transplantation**, 2010.

KHAN, M. R.; MARIUM, A.; SHABBIR, M.; SAEED, N.; BOKHARI, J. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Oxalis corniculata* against carbon tetrachloride (CCl₄) induced injuries in rat. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 30, p. 2255–2267, 2012.

KIM, H. G.; HAN, J. M.; LEE, H. W.; LEE, J. S.; SON, S. W.; CHOI, M. K.; LEE, D. S.; WANG, J. H.; SON, C. G. CGX, a multiple herbal drug, improves cholestatic liver fibrosis in a bile duct ligation-induced rat model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 653–662, 2013.

KNODELL, R. G.; BLACK, W. C.; CHEN, S.; KAPLOWITZ, N. Formulation and Application of a Numerical Scoring System for Assessing Histological Activity in Asymptomatic Chronic Active Hepatitis. v. 1, n. 5, 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 hepato-biliary-pancreatic surgery**, v. 6, n. 2, p. 171–5, 1999.

KOUNTOURAS, J.; BILLING, B. H.; SCHEUER, P. J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **British journal of experimental pathology**, v. 65, n. 3, p. 305–311, 1984.

LANZONI, G.; OIKAWA, T.; WANG, Y.; CUI, C.-B.; CARPINO, G.; CARDINALE, V.; GERBER, D.; GABRIEL, M.; DOMINGUEZ-BENDALA, J.; FURTH, M. E.; GAUDIO, E.; ALVARO, D.; INVERARDI, L.; REID, L. M.
Concise review: Clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. **STEM CELLS**, v. 31, n. 10, p. 2047–2060, out. 2013.

LEE, S. W.; KIM, S. H.; MIN, S. O.; KIM, K. S. Ideal Experimental Rat Models for Liver Diseases. **Korean journal of hepato-biliary-pancreatic surgery**, v. 15, n. 2, p. 67–77, 2011.

LI, T.; YAN, Y.; WANG, B.; QIAN, H.; ZHANG, X.; SHEN, L.; WANG, M.; ZHOU, Y.; ZHU, W.; LI, W.; XU, W. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 6, p. 120924123440009, 2013.

LIHUA, Y.; YUN, W.; XIAOHUA, W.; YANQING, L. EXPERIMENTAL STUDY Effect of allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cell transplan- tation in a rat model of hepatic cirrhosis. v. 35, n. 1, p. 63–68, 2015.

LIU, W.; LI, R.; DOU, K. Convenient and Efficient Enrichment of the CD133+ Liver Cells from Rat Fetal Liver Cells as a Source of Liver Stem/Progenitor Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 1, p. 94–102, 2011.

LOZANO, R.; NAGHAVI, M.; FOREMAN, K.; LIM, S.; SHIBUYA, K.; ABOYANS, V.; ABRAHAM, J.; ADAIR, T.; AGGARWAL, R.; AHN, S. Y.; ALMAZROA, M. A.; ALVARADO, M.; ANDERSON, H. R.; ANDERSON, L. M.; ANDREWS, K. G.; ATKINSON, C.; BADDOUR, L. M.; BARKER-COLLO, S.; BARTELS, D. H.; BELL, M. L.; BENJAMIN, E. J.; BENNETT, D.; BHALLA, K.; BIKBOV, B.; ABDULHAK, A. Bin; BIRBECK, G.; BLYTH, F.; BOLLIGER, I.; BOUFOUS, S.; BUCELLO, C.; BURCH, M.; BURNEY, P.; CARAPETIS, J.; CHEN, H.; CHOU, D.; CHUGH, S. S.; COFFENG, L. E.; COLAN, S. D.; COLQUHOUN, S.; COLSON, K. E.; CONDON, J.; CONNOR, M. D.; COOPER, L. T.; CORRIERE, M.; CORTINOVIS, M.; DE VACCARO, K. C.; COUSER, W.; COWIE, B. C.; CRIQUI, M. H.; CROSS, M.; DABHADKAR, K. C.; DAHODWALA, N.; DE LEO, D.; DEGENHARDT, L.; DELOSSANTOS, A.; DENENBERG, J.; DES JARLAIS, D. C.; DHARMARATNE, S. D.; DORSEY, E. R.; DRISCOLL, T.; DUBER, H.; EBEL, B.; ERWIN, P. J.; ESPINDOLA, P.; EZZATI, M.; FEIGIN, V.; FLAXMAN, A. D.; FOROUZANFAR, M. H.; FOWKES, F. G. R.; FRANKLIN, R.; FRANSEN, M.; FREEMAN, M. K.; GABRIEL, S. E.; GAKIDOU, E.; GASPARI, F.; GILLUM, R. F.; GONZALEZ-MEDINA, D.; HALASA, Y. A.; HARING, D.; HARRISON, J. E.; HAVMOELLER, R.; HAY, R. J.; HOEN, B.; HOTEZ, P. J.; HOY, D.; JACOBSEN, K. H.; JAMES, S. L.; JASRASARIA, R.; JAYARAMAN, S.; JOHNS, N.; KARTHIKEYAN, G.; KASSEBAUM, N.; KEREN, A.; KHOO, J.-P.; KNOWLTON, L. M.; KOBUSINGYE, O.; KORANTENG, A.; KRISHNAMURTHI, R.; LIPNICK, M.; LIPSHULTZ, S. E.; OHNO, S. L.; MABWEIJANO, J.; MACINTYRE, M. F.; MALLINGER, L.; MARCH, L.; MARKS, G. B.; MARKS, R.; MATSUMORI, A.; MATZOPOULOS, R.; MAYOSI, B. M.; MCANULTY, J. H.; MCDERMOTT, M. M.; MCGRATH, J.; MEMISH, Z. A.; MENSAH, G. A.; MERRIMAN, T. R.; MICHAUD, C.; MILLER, M.; MILLER, T. R.; MOCK, C.; MOCUMBI, A. O.; MOKDAD, A. A.; MORAN, A.; MULHOLLAND, K.; NAIR, M. N.; NALDI, L.; NARAYAN, K. M. V.; NASSERI, K.; NORMAN, P.; O'DONNELL, M.; OMER, S. B.; ORTBLAD, K.; OSBORNE, R.; OZGEDIZ, D.; PAHARI, B.;

PANDIAN, J. D.; RIVERO, A. P.; PADILLA, R. P.; PEREZ-RUIZ, F.; PERICO, N.; PHILLIPS, D.; PIERCE, K.; POPE, C. A.; PORRINI, E.; POURMALEK, F.; RAJU, M.; RANGANATHAN, D.; REHM, J. T.; REIN, D. B.; REMUZZI, G.; RIVARA, F. P.; ROBERTS, T.; DE LEÓN, F. R.; ROSENFELD, L. C.; RUSHTON, L.; SACCO, R. L.; SALOMON, J. A.; SAMPSON, U.; SANMAN, E.; SCHWEBEL, D. C.; SEGUI-GOMEZ, M.; SHEPARD, D. S.; SINGH, D.; SINGLETON, J.; SLIWA, K.; SMITH, E.; STEER, A.; TAYLOR, J. A.; THOMAS, B.; TLEYJEH, I. M.; TOWBIN, J. A.; TRUESEN, T.; UNDURRAGA, E. A.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; VIJAYAKUMAR, L.; VOS, T.; WAGNER, G. R.; WANG, M.; WANG, W.; WATT, K.; WEINSTOCK, M. A.; WEINTRAUB, R.; WILKINSON, J. D.; WOOLF, A. D.; WULF, S.; YEH, P.-H.; YIP, P.; ZABETIAN, A.; ZHENG, Z.-J.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, dez. 2012.

LUK, J. M.; ZHANG, Q. S.; LEE, N. P.; WO, J. Y.; LEUNG, P. P.; LIU, L. X.; HU, M. Y.; CHEUNG, K. F.; HUI, C. K.; LAU, G. K.; FAN, S. T. Hepatic stellate cell-targeted delivery of M6P-HSA-glycyrrhetic acid attenuates hepatic fibrogenesis in a bile duct ligation rat model. **Liver International**, v. 27, n. 4, p. 548–557, 2007.

LUO, B.; ABRAMS, G. A.; FALLON, M. B. Endothelin-1 in the rat bile duct ligation model of hepatopulmonary syndrome: Correlation with pulmonary dysfunction. **Journal of Hepatology**, v. 29, n. 4, p. 571–578, 1998.

MACHIMOTO, T.; YASUCHIKA, K.; KOMORI, J.; ISHII, T.; KAMO, N.; SHIMODA, M.; KONISHI, S.; SAITO, M.; KOHNO, K.; UEMOTO, S.; IKAI, I. Improvement of the Survival Rate by Fetal Liver Cell Transplantation in a Mice Lethal Liver Failure Model. **Transplantation**, v. 84, n. 10, p. 1233–1239, nov. 2007.

MANSUROGLU, T.; DUDÁS, J.; ELMAOUHOUB, A.; JOZA, T. Z.; RAMADORI, G. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 1, p. 11–19, 2009.

MARQUES, T. G.; CHAIB, E.; DA FONSECA, J. H.; LOURENÇO, A. C. R.; SILVA, F. D.; RIBEIRO, M. A. F.; GALVÃO, F. H. F.; D'ALBUQUERQUE, L. A. C. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection. **Acta cirúrgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 27, n. 8, p. 589–94, 2012.

MARTINS, P. N. a; NEUHAUS, P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. **Liver International**, v. 27, n. 3, p. 384–392, 2007.

OERTEL, M. Fetal liver cell transplantation as a potential alternative to whole liver transplantation? **Journal of Gastroenterology**, v. 46, n. 8, p. 953–965, 2011.

- OERTEL, M.; MENTHENA, A.; CHEN, Y.-Q.; TEISNER, B.; JENSEN, C. H.; SHAFRITZ, D. A. Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver. **Gastroenterology**, v. 134, n. 3, p. 823–32, 2008.
- OERTEL, M.; MENTHENA, A.; DABEVA, M. D.; SHAFRITZ, D. A. Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. **Gastroenterology**, v. 130, n. 2, p. 507–520, 2006.
- PATIL, P. B.; BEGUM, S.; JOSHI, M.; KLEMAN, M. I.; OLAUSSON, M.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Phenotypic and in vivo functional characterization of immortalized human fetal liver cells. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 49, n. 6, p. 705–14, 2014.
- PAVANATO, A.; TUÑÓN, M. J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; MARRONI, C. A.; LLESUY, S.; GONZÁLEZ-GALLEGU, J.; MARRONI, N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Digestive diseases and sciences**, v. 48, n. 4, p. 824–9, abr. 2003.
- PAYUSHINA, O. V.; BUTORINA, N. N.; SHEVELEVA, O. N.; KOZHEVNIKOVA, M. N.; STAROSTIN, V. I. Cell Composition of the Primary Culture of Fetal Liver. n. 4, p. 566–573, 2013.
- PEREIRA, T. N.; WALSH, M. J.; LEWINDON, P. J.; RAMM, G. a. Paediatric cholestatic liver disease: Diagnosis, assessment of disease progression and mechanisms of fibrogenesis. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 1, n. 2, p. 69–84, 2010.
- 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 and Tissue Banking**, v. 14, n. 3, p. 475–488, 2013.
- 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, n. 3, p. 441–453, 2011.
- SANTOS, J. L.; CARVALHO, E.; BEZERRA, J. A. Advances in biliary atresia: From patient care to research. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 6, p. 522–527, 2010.
- SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N. H. Liver cirrhosis. **The Lancet**, v. 371, n. 9615, p. 838–851, 2008.
- SEMERARO, R.; CARDINALE, V.; CARPINO, G.; GENTILE, R.; NAPOLI, C.; VENERE, R.; GATTO, M.; BRUNELLI, R.; GAUDIO, E.; ALVARO, D. The fetal liver as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas. v. 1, n. 7, p. 1–10, 2013.
- SEMERARO, R.; CARPINO, G.; CARDINALE, V.; ONORI, P.; GENTILE, R.;

CANTAFORA, A.; FRANCHITTO, A.; NAPOLI, C.; ANCESCHI, M.; BRUNELLI, R.; BOSCO, D.; TORRICE, A.; REID, L.; GAUDIO, E.; ALVARO, D. Multipotent stem/progenitor cells in the human foetal biliary tree. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 987–994, 2012.

SRINIVAS, A.; RAO, P. J.; SELVAM, G.; GOPARAJU, A.; MURTHY, B. P.; REDDY, N. P. Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. **Human & Experimental Toxicology**, v. 31, n. 11, p. 1113–1131, 1 nov. 2012.

TABIBIAN, J. H.; MASYUK, A. I.; MASYUK, T. V.; O'HARA, S. P.; LARUSSO, N. F. Physiology of cholangiocytes. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 541–565, 2013.

TANIMIZU, N.; MIYAJIMA, A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 15, p. 3165–74, 2004.

TSOCHATZIS, E. A.; BOSCH, J.; BURROUGHS, A. K. Liver cirrhosis. **The Lancet**, v. 383, n. 9930, p. 1749–1761, 2014.

VALI, S. M.; VISHWAKARMA, S. K.; BARDIA, A.; TIWARI, S. K.; G.SRINIVAS; RAJ, A.; TRIPURA, C.; NALLARI, P.; HABEEB, M. A.; KHAN, G. P. and A. A. Isolation and Characterization of Stem Cells Sub Population within the Human Fetal Liver. **Cell Biology: Research & Therapy**, v. s1, 2014.

WIJESUNDERA, K. K.; IZAWA, T.; TENNAKOON, A. H.; MURAKAMI, H.; GOLBAR, H. M.; KATOU-ICHIKAWA, C.; TANAKA, M.; KUWAMURA, M.; YAMATE, J. M1- and M2-macrophage polarization in rat liver cirrhosis induced by thioacetamide (TAA), focusing on Iba1 and galectin-3. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 96, n. 3, p. 382–392, 2014.

WOO, S.-Y.; PARK, M.; LEE, H. J.; KIM, J.-Y.; RYU, K.-H. Tonsil-derived stromal cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice via autophagy activation (P2180). **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1 Supplement, p. 69.28-69.28, 2013.

XU, J.; CONG, M.; PARK, T. J.; SCHOLTEN, D.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. Contribution of bone marrow-derived fibrocytes to liver fibrosis. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 4, n. 1, p. 34–47, 2015.

YAP, Kiryu K. Modelling human development and disease: The role of animals, stem cells, and future perspectives. **Australian General Practice Training**, p. 8, 2012.

YOVCHEV, M. I.; GROZDANOV, P. N.; JOSEPH, B.; GUPTA, S.; DABEVA, M. D. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. **Hepatology**, v. 45, n. 1, p. 139–149, 2007.

YOVCHEV, M. I.; XUE, Y.; SHAFRITZ, D. A.; LOCKER, J.; OERTEL, M. Repopulation of the fibrotic/cirrhotic rat liver by transplanted hepatic stem/progenitor cells and mature hepatocytes. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 284–

295, jan. 2014.

ZAGOURA, D. S.; ROUBELAKIS, M. G.; BITSIKA, V.; TROHATOU, O.; PAPPA, K. I.; KAPELOUZOU, A.; ANTSAKLIS, A.; ANAGNOU, N. P. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 894–906, 2012.

ZATOŃSKI, W. A.; SULKOWSKA, U.; MAŃCZUK, M.; REHM, J.; BOFFETTA, P.; LOWENFELS, A. B.; LA VECCHIA, C. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. **European addiction research**, v. 16, n. 4, p. 193–201, 2010.

ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7312–7324, 2014.