



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Priscila Modesto Silvestre

**AVALIAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMO ARCABOUÇO PARA
CÉLULAS TRONCO EM FÍGADOS CIRRÓTICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lucilene Delazari dos Santos

**Botucatu/SP
2015**

Priscila Modesto Silvestre

**AVALIAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMO ARCABOUÇO PARA
CÉLULAS TRONCO EM FÍGADOS CIRRÓTICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Barraviera
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lucilene Delazari dos Santos

Botucatu/SP

2015

Nome do Autor: PRISCILA MODESTO SILVESTRE

Título: AVALIAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA COMO ARCABOUÇO PARA
CÉLULAS TRONCO EM FÍGADOS CIRRÓTICOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Benedito Barraviera

Orientador

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de
Medicina de Botucatu – UNESP e Centro de Estudos de Venenos e Animais
Peçonhentos da UNESP – CEVAP

Prof. Dr. Carlos Antônio Caramori

Membro

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu –
UNESP

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Membro

Departamento de Anatomia da Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Biologia, UNICAMP

Data da defesa: 27 de fevereiro de 2015.

Dedicatória

Dedico ao meu Pai e ao meu filho. Ao meu pai que sempre me incentivou a estudar e batalhar pelas coisas que quero. Que sempre ficou ao meu lado em todos os momentos, aqueles que eu comemorava e aqueles que eu desanimava devido às coisas não saírem como eu desejava. Você pai é a pessoa que me fez trabalhar com muito amor e dedicação, pois foi o senhor que me ensinou o que realmente vale a pena na vida. Ao meu filho, que sem a menos saber, colocou sabedoria em meu caminho e me mostrou o que quero.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela vida maravilhosa que tenho e por todos os problemas que vivi, pois sem eles não teria incentivo para melhorar, sempre assim resolvendo-os da melhor maneira possível e aprendendo muito com eles.

A meu orientador, **Prof. Dr. Benedito Barraviera**, por todo apoio, dedicação, pelas ideias construtivas, pela oportunidade de realizar este trabalho e por todas as cobranças e exigências para que sempre buscássemos resultados cada vez melhores, chegando assim a conclusão de mais uma etapa.

A minha co-orientadora **Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos** que me ensinou a andar com minhas próprias pernas. No primeiro momento me levando pela mão e após me fazendo caminhar sozinha e me auxiliando para que tudo desse certo. Muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior** que me ajudou imensamente com todas minhas dúvidas e me acompanhou em todas as fases da nossa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Carlos Antonio Caramori** que foi um dos responsáveis pela ideia do projeto, por ter me auxiliado em tudo que precisava e por pacientemente ter analisado lâmina por lâmina comigo, me ensinando todas as análises morfológicas necessárias.

A **Profª. Drª. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, por abrir as portas de seu laboratório e permitir a realização de meus estudos e experimentos.

Ao **Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior**, por também abrir as portas de seu laboratório, permitir a realização de meus estudos e experimentos e me auxiliar nas técnicas e leitura dos resultados.

A **Dra. Elenize Jamas Pereira** que me auxiliou em todos os momentos necessários. Muito obrigada.

A **Bruna Quirino Jorgetto, Solange Sako Cagliari, Regina Celia Spadin e Diego C. B. de Oliveira** pela disponibilidade, paciência e prontidão em ajudar. Muito obrigada!

A **Alexandrina Sartori** muito obrigada pela disponibilidade e por todo suporte.

A minha **mãe**, por ter me ajudado imensamente na criação do meu filho, em que isso me ajudou a fazer todo o meu trabalho com muito mais tranquilidade. Te amo muito!

Ao meu **pai**, sem ele isso não seria possível. Foi ele que sempre me incentivou para que eu estudasse e estudasse e brigou muitas vezes comigo por causa disso. Muito obrigada pelas brigas e pelo companheirismo pai, a sua educação foi esplendorosa. Amo-te muito!

Ao **meu filho** por simplesmente existir!

Ao **Airton Junior**, meu namorado, amigo, companheiro. Pelo amor, dedicação e paciência. Amo você.

Aos meus **amigos** pessoais e de trabalho Airton, Luciana, Isabel, Patrícia Mendes, Aline, Letícia, Fausto, Vivian, Natalia, Patrícia Orsi, Daniela Fossato e Juliana Simon sem a ajuda de vocês isso não teria acontecido. Obrigada pela força.

Aos **amigos** pessoais, Valéria, Fernanda, Jamile, Michele, Samara, Rafael Veloso, Ariela e Thiago que ficaram me ouvindo reclamar ou comemorar quase todos os finais de semana com muita paciência. Obrigada por tudo.

Ao **Dr. João Ferreira de Lima, Dr. Paulo Bersano de Oliveira e Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo** pelo incentivo, pela disposição em ajudar

e discutir o projeto, pelas contribuições, pelo grande conhecimento a mim transmitido e pela amizade.

Aos **colegas do laboratório** da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Aos **colegas do laboratório** do IB – UNESP – Botucatu, principalmente ao Sérgio Alexandre Alcantra dos Santos e Jaqueline Rinaldi que me deram todo auxílio dedicando seu tempo a me ajudar e ensinar alguns processos desenvolvidos no projeto.

Aos colegas do laboratório da **UNIPEX**, Diego, Paulo, Mauro, Carlos, Elizete, Elenize e Sueli por toda ajuda no nosso trabalho.

Aos **funcionários do CEVAP**, Granieri, Marcos, Dona Dirce, Sheila, Sandra, Marli, Sérgio pelas colaborações e momentos de alegria.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que por algum descuido não foram mencionados, mas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

As oportunidades são como o nascer do sol, se você esperar demais... pode perdê-las.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativa de mortes por cirrose, de acordo com o <i>Global Burden of Disease</i>	1
Figura 2	Fonte: Ramaiah; Apte; Mehendale, 2011. Esquema ilustrativo da metabolização da Tioacetamida.....	3
Figura 3	SFDPS mimetizando a etapa final da cascata de coagulação.(Desenvolvido por Barros et al.,(21) com algumas modificações.).....	6
Figura 4A	Modelo de contentor de ratos para auxiliar na anestesia e na coleta de material. A: Aparelho de anestesia inalatória para animais.....	14
Figura 4B	<i>Rattus norvegicus</i> anestesiado após 20 semanas de tratamento com tioacetamida para aplicação do tratamento selecionado.....	14
Figura 5	Aplicação do tratamento selecionado no lobo direito do fígado 20 semanas após o tratamento com tioacetamida.....	14
Figura 6	Cirurgia realizada após 20 semanas de tratamento com tioacetamida para demonstração dos vários nódulos de regeneração.....	16
Figura 7	Perfil bioquímico do aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) (U/L) durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.....	16
Figura 8	Perfil bioquímico de ureia e glicose (mg/dL), durante a indução da cirrose pela tioacetamida (mg/dL) durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.....	16
Figura 9	Perfil bioquímico de albumina (g/dL), proteína C reativa (mg/L) e bilirrubina total (mg/DL) durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.....	17
Figura 10AB	Análise histológica do fígado dos animais do grupo branco após tratamento com tioatemaída durante 20 semanas. A: Feixe de fibrose. B: Nódulos com feixe de fibrose. Avaliação pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) aumento de 20X.....	18
Figura 11	Análise histológica do fígado dos animais do grupo branco após tratamento com tioatemaída por 20 semanas observando-se nódulos com feixe de fibrose. Avaliação pela coloração Picrosirius Red. aumento 20x.....	18

Figura 12	Morfologia fibroblastóide (seta preta) característica das CTMs, observadas em microscopia óptica de luz invertida. MO (200X).....	19
Figura 13	Serinoprotease conjugada com Alexa Fluor 488 Microscale Protein Kit (A30006 – Lifetechnologies), emitindo fluorescência (ex/em: 494/519nm), serinoprotease sinalizada pela coloração verde.....	21
Figura 14AB	A: Lobo direito de animal eutanasiado após dois dias de cirurgia, demonstrando pela coloração verde a presença da serinoprotease marcada. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde. B: Lobo esquerdo do mesmo animal, também demonstrando a presença da serinoprotease marcada pela coloração verde. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde.....	21
Figura 15AB	A: Lobo direito de animal eutanasiado após três dias de cirurgia demonstrando pela coloração verde a presença da serinoprotease. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde. B: Lobo esquerdo do mesmo animal, também demonstrando a presença da serinoprotease marcada. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde.....	22
Figura 16	Análise de quantificação na microscopia confocal demonstrando a seleção dos pontos escolhidos aleatoriamente para observação dos diferentes picos de fluorescência, ratificado na figura 17.....	22
Figura 17	Demonstração dos diferentes picos de fluorescência, demonstrando a diferença da autofluorescência do tecido e sinalização da serinoprotease. Seleção dos pontos A a H. A a D: Picos da serinoprotease sinalizada; E a H: Picos de autofluorescência do tecido.....	23
Figura 18AB	Demonstração da presença das CTMs pela análise da microscopia confocal após 15 dias de cirurgia no grupo SFDPS + CTMs. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. A: Lobo direito com presença de CTMs. B: Lobo esquerdo com presença de CTMs.....	25
Figura 19AB	Demonstração da ausência das CTMs pela análise da microscopia confocal após 15 dias de cirurgia no grupo CTMs. O azul marcou o DNA celular e o as CTMs marcadas em verde com o kit EDU não foram observadas. A: Lobo direito com ausência de CTMs. B: Lobo esquerdo com ausência de CTMs.....	25

Figura 20AB	Demonstração da presença da CTMs pela análise de microscopia confocal após 30 dias de cirurgia no grupo SFDPS + CTMS. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. A: Lobo direito com presença de CTMs. B: Lobo esquerdo com presença de CTMs.....	26
Figura 21AB	Demonstração da presença da CTMs pela análise de microscopia confocal após 30 dias de cirurgia no grupo CTMs. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. A: Lobo direito com presença de CTMs. B: Lobo esquerdo com presença de CTMs.....	26
Figura 22	Fixação das CTMs do lobo direito do fígado após 15 dias de tratamento com ou sem selante.....	28
Figura 23	Migração da CTMs do lobo direito para esquerdo do fígado após 15 dias de tratamento com ou sem selante.	28
Figura 24	Fixação das CTMs no lobo direito do fígado após 30 dias de tratamento com ou sem selante.....	28
Figura 25	Migração da CTMs do lobo direito para esquerdo do fígado após 30 dias de tratamento com ou sem selante.....	28

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Protocolo experimental de indução da cirrose hepática pela tioacetamida em <i>Rattus novergicus</i>	10
Tabela 2	Protocolo experimental da avaliação bioquímica dos <i>Rattus novergicus</i>	11
Tabela 3	Tabela 3 – Distribuição das medianas e dos valores máximos e mínimos obtidos das análises bioquímicas de Ureia, AST, ALT, albumina, PCR, glicose e bilirrubinas, realizadas antes e durante a indução da cirrose.....	17
Tabela 4	Resultados da marcação celular observada na citometria de fluxo.....	20
Tabela 5	Distribuição dos parâmetros estáticos do fígado demonstrando a diferença entre marcação da proteína e autofluorescência do tecido.....	24
Tabela 6	Análise da fixação e da migração das CTMs nos lobos direito e esquerdo após a aplicação com ou sem SFDPS aos 15 e 30 dias de observação.....	27

SUMÁRIO

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Cirrose.....	1
1.2. Tioacetamida.....	1
1.3. Selante de fibrina.....	4
1.3.1. Breve histórico dos selantes de fibrina.....	4
1.3.2. Ensaio pré-clínicos e clínicos com o novo selante de fibrina (SFDPS).....	4
1.4. O uso de matrizes como arcabouços.....	6
1.5. Células tronco: uma terapia alternativa na recuperação de fígados cirróticos?.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo geral.....	9
2.2. Objetivos específicos.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Animais.....	10
3.2. Indução da cirrose hepática.....	10
3.3. Coleta de sangue.....	11
3.4. Avaliação Bioquímica.....	11
3.5. Selante de Fibrina.....	11
3.6. Colheita, obtenção e isolamento das CTMs da medula óssea de <i>Rattus norvegicus</i>	11
3.7. Caracterização das células tronco.....	12
3.8. Biomarcação da serinoprotease.....	12
3.9. Método Cirúrgico.....	12
3.10. Processamento do material.....	13
3.11. Rastreamento das células tronco mesenquimais.....	15
3.12. Comitê de Ética.....	15
3.13. Análises Estatísticas.....	15
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Cirrose induzida pela tiocetamida.....	15

4.2	Análise das CTMs por Citometria de fluxo.....	18
4.3	Biomarcação da serinoprotease utilizada no selante de fibrina.....	20
4.4	Análises da Imunomarcação.....	24
5.	DISCUSSÃO.....	29
6	CONCLUSÕES.....	35
7	REFERÊNCIAS.....	37
8	APÊNDICE.....	46

SILVESTRE, P.M. **Avaliação da selante de fibrina como arcabouço para células tronco em fígados cirróticos.** Botucatu, 2015. xp. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Departamento de Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

INTRODUÇÃO: A cirrose é o estágio final da doença hepática. Causada principalmente pelas hepatites virais e ingestão de álcool, o único tratamento específico atual é o transplante. O projeto *Global Burden of Disease* (GBD) publicou recentemente na BMC Medicine uma nova avaliação da mortalidade pela cirrose. Vários métodos e fontes de dados levaram a estimativa global de pouco mais de um milhão de mortes em 2010, cerca de 2% de todas as mortes. Nos últimos anos, as pesquisas biotecnológicas favoreceram a descoberta da terapia alternativa para cirrose usando células tronco. Estas geraram grande expectativa na regeneração tecidual e sua aplicação no tratamento. Um dos grandes desafios enfrentados foi sua reduzida fixação das células no fígado, com dispersão para todo organismo e sem a efetividade esperada. As metodologias ainda não encontraram uma maneira eficaz de impedir que estas células difundam para os outros órgãos diminuindo sua eficácia pretendida. **OBJETIVO:** Avaliar o selante de fibrina derivado da peçonha de serpente (SFDPS) como arcabouço para células tronco mesenquimais (CTMs) em fígados cirróticos. **MÉTODOS:** O modelo de cirrose experimental em ratos foi induzido pela tioacetamida (C_2H_5NS), aplicada duas vezes por semana por via intraperitoneal (i.v.) na dose de 200mg/kg. A coleta de sangue foi realizada uma vez por mês para as análises bioquímicas. O isolamento das células tronco foi realizado de acordo com Gasparotto *et al.*, 2014. A marcação para citometria foi realizada em segunda passagem com os marcadores RT1 AW2 FITC, CLASS RT1 PE, CD11b, CD44, CD90, CD34, CD105, CD73, CD45, ICAM. A biomarcação da serinoprotease, um dos componentes do selante, foi realizada com o kit Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (A30006v). A cirurgia foi realizada sob anestesia inalatória com isoflurano; os animais foram selecionados aleatoriamente em três grupos os quais receberam o tratamento especificado. Na histologia os cortes foram de 5µm para coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius. A

imunomarcaco foi realizada de acordo com o protocolo do Kit Click-iT® EdU Imaging Kits

RESULTADOS: O desenvolvimento da cirrose foi macroscopicamente eficiente, demonstrando intensos nódulos de regeneraco. As análises bioquímicas demonstraram alteraces nas enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A ureia, glicose, albumina, proteína-C-reativa e bilirrubina não se alteraram significativamente. As análises histológicas pelas coloraces HE e Pricosirius demonstraram a presença da cirrose. A citometria de fluxo demonstrou um cultivo heterogneo com porcentagem maior para CTMs comparado com as células mononucleares. Dos 100 µg de serinoprotease submetidos  biomarcaco a análise pela espectrofotometria mostrou que foram sinalizados 68 µg que corresponde a 68% da amostra. Na análise da fluorescência observou-se a serinoprotease sinalizada *in vitro* e na microscopia confocal *in vivo*. Como o tecido hepático tem autofluorescência foi realizada a quantificaco demonstrando a diferença nos picos do tecido e da sinalizaco da serinoprotease. Nas análises de imunomarcaco das células foi demonstrada pela microscopia confocal a presença de CTMs no grupo com CTMs + SFDPS aos 15 dias, mas não no grupo CTMs. Aos 30 dias de análise as CTMs apareceram nos dois grupos experimentais.

CONCLUSÃO: O método de cirrose experimental proposto por Said *et al.* foi reproduzido com sucesso. Os exames laboratoriais e anatomopatológicos confirmaram o desenvolvimento da cirrose hepática. As CTMs foram confirmadas principalmente pelos marcadores positivos CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54. A serinoprotease utilizada na composico do SFDPS foi biomarcada pela primeira vez na literatura mundial. Após a aplicacão a serinoprotease se difundiu para todo parênquima hepático. O SFDPS manteve as CTMs pelo menos trinta dias no sítio de inoculaco podendo ser um importante arcabouço. As CTMs não apareceram no grupo CTMs após 15 dias de tratamento, porém reapareceram 30 dias após. Acredita-se que isso ocorreu porque as CTMs foram difundidas pelo sangue e aos 30 dias voltaram para o fígado por causa dessa difusão sangnea e da presença da cirrose.

Palavras chave: Fígado, cirrose, selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFDPS), *Crotalus durissus terrificus*

SILVESTRE, P.M. **Fibrin sealant of the evaluation as a scaffold for stem cells in cirrhotic livers.** Botucatu, 2015. xp. Dissertation (Master) – Botucatu Medicine School – FMB, Tropical Diseases Department, Univ Estadual Paulista - UNESP

ABSTRACT

Introduction: Cirrhosis is the final stage of liver disease mainly caused by viral hepatitis, alcohol intake, and currently it can only be reversed by liver transplantation. In a new assessment of mortality of liver cirrhosis by design Global Burden of Disease (GBD) in the BMC Medicine, a variety of methods and data sources has led to an overall estimate of just over a million deaths in 2010, which was about 2% of all deaths. In recent years, research has intensified on biotech issues, favoring therapeutic discovery of stem cells to cirrhosis, which have generated great expectations in tissue regeneration of the liver and its application. However, a major problem faced was its low setting in cirrhotic liver, with spread to the whole body and without the expected effectiveness. The investigations have not yet found a way to effectively prevent stem cells spread to other organs reducing their effectiveness regeneration.

AIM: Evaluate the fibrin glue derived from snake venom (SFDPS) as a scaffold for stem cells in cirrhotic livers. **Methods:** The model of experimental cirrhosis in rats was induced by Thioacetamide (C₂H₅NS), twice per week intraperitoneally (iv) at 200 mg / kg. The of blood collection was performed for biochemical analysis in B200 equipment. Isolation of stem cells was performed according Gasparotto et al. 2014. The markup for cytometry was performed on the second pass with markers RT1 AW2 FITC, CLASS RT1 PE, CD11b, CD44, CD90, CD34, CD105, CD73, CD45, ICAM. The biomarker of serine protease was performed with Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (A30006v) kit. The surgery has been realized with inhalational anesthesia, the animals were separated into three groups where they received the treatment selected. Histology of 5µm sections were hematoxylin and eosin for staining (HE) and Picrosirius. Immunostaining was performed according to kit Click-it® Imaging kits EdU. **RESULTS:** The development of cirrhosis was macroscopically efficiently, demonstrating intense regenerative nodules. Biochemical analyzes demonstrated changes in the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and

aspartate aminotransferase (AST), however urea, glucose, albumin, C-reactive protein and bilirubin no changes were observed. Histological analysis demonstrated the effectiveness of the treatment by HE staining and Picrosirius. Flow cytometry demonstrated a heterogeneous culture with the highest percentage for MSCs compared with mononuclear cells. The values found in the analysis of spectrophotometer was 68 µg corresponding to 68% of 100µg of marked serinoprotease. In the analysis of flurescência observe the marked serine protease in vitro and in confocal microscopy we observed a marked serine protease in vivo and quantification was performed demonstrating the difference the peaks of autofluorescence of the tissue and marking of serine protease. In the analysis of immunostaining was demonstrated in confocal microscopy the presence of MSCs in the group with MSCs + FGDSV to 15 days however there was no presence in the MSCs group. However the analysis of immunostaining at 30 days MSCs appear in both groups. **CONCLUSION:** We conclude that carbon tetrachloride was not reproduced from the literature. Since the method by Said et al. using thioacetamide was successfully reproduced. Laboratory and pathological examinations confirmed the development of liver cirrhosis. MSCs were mostly confirmed by positive markers CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54. The serine protease used the SFDPS composition was biomarcada the first time in world literature. The serine protease diffused throughout the liver parenchyma. SFDPS remained MSCs at least fifteen days in the inoculated area We conclude that SFDPS can be a important framework for it retained the MSCs after 15 days of treatment, but presented in MSCs group after 30 days of treatment, it is believed that this was because the MSCs were broadcast by blood and 30 days returned to the liver because this blood diffusion.

Keyword: Liver, cirrhosis, fibrin sealant derived from snake venom (FSDSV), *Crotalus durissus terrificus*

1. INTRODUÇÃO

1.1- Cirrose

A cirrose, do ponto de vista anatomoclínico é caracterizada como uma condição que atinge todo o fígado e transforma sua estrutura em nódulos hepatocitários regenerativos de diâmetros variáveis, separados entre si por septos fibrosos de diferentes espessuras. O conceito clínico implica numa doença crônica do fígado que cursa com graus variáveis de insuficiência e de hipertensão da veia porta (1, 2).

Quando instalada, o tratamento consiste basicamente na atenuação das complicações, tais como a ascite, a encefalopatia hepática e as hemorragias digestivas. O único tratamento definitivo dessa condição é o transplante hepático (3). O projeto *Global Burden of Disease* (GBD) publicou recentemente na BMC Medicine uma nova avaliação da mortalidade pela cirrose. Vários métodos e fontes de dados levaram a estimativa global de pouco mais de um milhão de mortes em 2010, cerca de 2% de todas as mortes. (4).

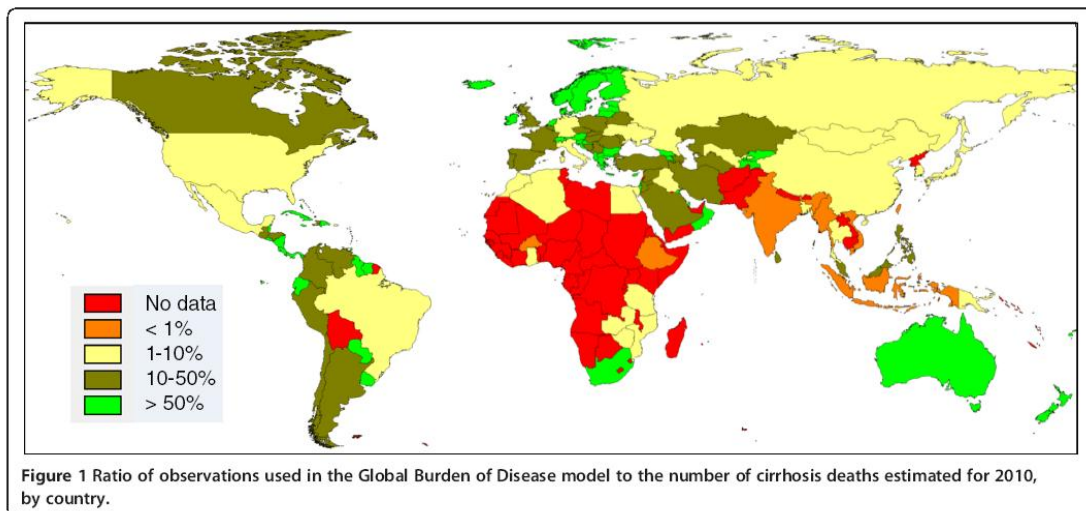


Figura 1: Estimativa de mortes por cirrose, de acordo com o *Global Burden of Disease*. (4).

1.2 - Tioacetamida

A tioacetamida (TAA), de acordo com Muños Torres *et al.*, 1991(5) e David *et al.*, 2002 (6) até 1943 era utilizada como fungicida em lavouras de laranja. Devido ao uso indiscriminado foi encontrado contaminação no suco e

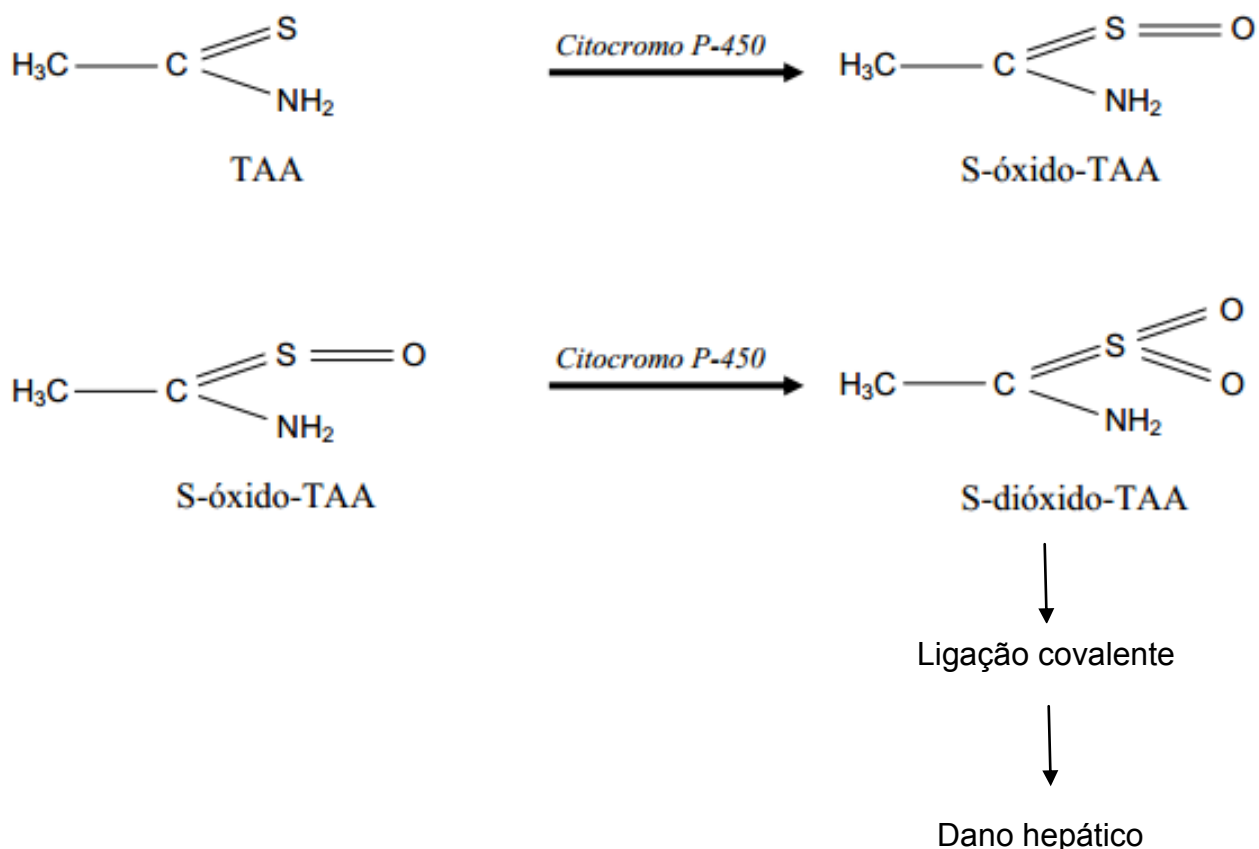
considerada, desde então, um risco à saúde pública. Em 1948 descobriu-se que a administração crônica da substância levava à cirrose hepática e aos hepatocarcinomas. Atualmente, a TAA é utilizada nas indústrias de couro, papel e têxtil, além de ser empregada na vulcanização da borracha e como estabilizador de combustíveis (7,8).

A TAA requer ativação metabólica para que seu efeito seja tóxico. Os produtos resultantes da sua biotransformação são S-óxido e S-dióxido de tioacetamida. Estes detalhes estão mostrados na Figura 2. (6,8).

O efeito citotóxico dessa droga é atribuído ao último metabólito, um composto instável altamente reativo que se liga covalentemente às macromoléculas teciduais (8,9).

A TAA é ativada pela ação catalítica do complexo microsomal citocromo P-450 localizado no retículo endoplasmático liso. O sistema enzimático citocromo P-450 compreende várias isoenzimas das quais a CYP2E1 (Citocromo P4502E1) parece ser a que está mais envolvida na metabolização da TAA (7). Esta enzima é a principal família de citocromo P-450 do fígado dos mamíferos, desempenhando papel crucial no metabolismo, na toxicidade e na carcinogênese de xenobióticos (10,11), além de metabolizar vários outros compostos de baixo peso molecular (8,9).

De acordo com Tunez *et al.*, 2005 (12) a TAA reduz a atividade antioxidante e acentua a peroxidação lipídica do fígado, estabelecendo uma condição de estresse oxidativo que culmina com a necrose celular. Os radicais livres gerados por esta via oxidativa, além de causarem peroxidação lipídica nas membranas, provocam aumento no cálcio citosólico, inibem a glutatona e a redução dos grupos tiol (-SH), acometendo severamente as células da região acinar pericentral e levando a morte celular. A concentração intracelular de glutatona e os níveis de tiol atuam sobre o DNA, modulando a síntese e protegendo-o do dano oxidativo (13,14). A toxicidade da TAA leva à destruição do parênquima com rompimento de endomembranas e perda da matriz citoplasmática (5,8).



Fonte: Ramaiah; Apte; Mehendale, 2011.

Figura 2: Esquema ilustrativo da metabolização da tioacetamida (15)

Os compostos derivados da TAA, aparentemente são responsáveis pela inativação de enzimas e de proteínas estruturais. A necrose provocada por esta droga está relacionada a alterações na concentração citoplásmica do cálcio, o que afeta principalmente mitocôndrias e leva a inibição da respiração celular. A ação da TAA sobre o metabolismo dos ácidos nucleicos é evidenciada por nucleolos aumentados e pela inibição no transporte do RNA do núcleo para o citoplasma (8,16). Além disso, a TAA altera o ciclo da ureia, o perfil dos aminoácidos circulantes, o metabolismo lipídico e lipoproteico e a síntese de ácidos graxos (6,8)

A fibrose induzida por TAA é considerada mais lenta quando comparada com outros agentes hepatotóxicos. Entretanto o desenvolvimento tardio da doença é visto como mais uma das características em produzir adequadamente o estado crônico da doença hepática (17).

A administração crônica dessa hepatotóxina provoca perda de peso, necrose celular, fibrose progressiva levando a cirrose e proliferação dos ductos biliares (16, 18, 19, 20).

1.3 - Selante de fibrina

1.3.1 – Breve histórico dos selantes de fibrina

Os selantes de fibrina, compostos de fibrinogênio e trombina concentrados, foram estudados e desenvolvidos a partir do início de 1900 (21, 22). A atividade do selante de fibrina é baseada na cascata da coagulação sanguínea cuja etapa final envolve a conversão do fibrinogênio em moléculas de fibrina por ação da trombina. Esta última quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina gerando um complexo insolúvel. Assim, estas substâncias são fundamentais e mediam a coagulação que leva a formação de um coágulo capaz de estancar sangramentos (23)

A primeira divulgação do uso de compostos de fibrina foi publicada por Bergel em 1909 (24). A combinação de fibrinogênio autólogo e solução de trombina foram relatadas primeiramente em 1940, por Young e Medawar (25).

Depois de várias tentativas e resultados insatisfatórios o primeiro selante de fibrina foi liberado na Europa por volta de 1980. Nos Estados Unidos, o Food and Drugs Administration (FDA) proibiu o uso até a década de 1990 por causa dos riscos de transmissão de doenças infecciosas. Isto porque estes selantes eram extraídos a partir de sangue humano e trombina animal (21).

1.3.2 – Ensaios pré-clínicos e clínicos com o novo selante de fibrina (SFDPS)

A ideia de produção de um novo selante de fibrina foi proposta em 1989 pelo grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), Unidade da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. O principal motivo deste projeto foi a produção de um selante de fibrina que não utilizasse componentes de sangue humano. Desta maneira, um crioprecipitado extraído a partir de grandes animais foi produzido para substituir o fibrinogênio humano. Uma fração proteica com ação coagulante extraída do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi usada em

substituição à trombina bovina (21). A Figura 3 mostra o efeito da fração proteica extraída de *Crotalus durissus terrificus* sobre o fibrinogênio.

A aplicabilidade deste selante composto de fibrinogênio extraído de grandes animais e de enzimas trombin-like, hoje conhecidas como serinoproteases, extraídas a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foi testado em animais e seres humanos (21). Viterbo *et al.*, (1993) examinaram a eficácia do selante de fibrina na reparação de nervo ciático de ratos usando fibrinogênio de bubalinos, equinos, bovinos, ovinos e humano (26). Estes diferentes tipos de fibrinogênio foram comparados com o selante de fibrina comercial Tyssucol. Os resultados indicaram que fibrinogênio extraído de bubalinos era a alternativa mais importante para a reparação de nervos periféricos (26), Stolf em 1999 foi quem avaliou pela primeira vez em seres humanos, a eficácia do selante na cirurgia da pele e compararam os resultados com as suturas convencionais (21,27). Barbosa *et al.*, (2007, 2008) (28, 29) e Chiquito em 2007 (30) avaliaram a aplicabilidade do selante de fibrina em cirurgia periodontal com sucesso. Em 2011 Gatti *et al.* (31) estudaram este biomaterial como uma alternativa para tratamento de úlceras venosas crônicas. Estes últimos autores concluíram os diversos benefícios do produto para uso tópico: fácil aplicação, diminuição da dor, o paciente tem alta precoce do hospital e é de custo reduzido (28,29,30, 31). Estes resultados animadores motivaram Abbade *et al* (32) a avaliar a segurança e a melhor dose do produto em 10 participantes com úlceras venosas crônicas. Os resultados serão apresentados agora em março de 2015, no 73rd Annual Meeting of the American Academy of Dermatology. TBA, San Francisco, California, USA. De acordo com Abbade *et al.* (32) o produto avaliado é seguro, candidato e clinicamente promissor para diversas áreas da medicina, além da Dermatologia. Ensaio multicêntricos, com maior número de participantes, deverão ser realizados para se comprovar a eficácia do produto, estabelecer a melhor dose e o tempo mínimo de utilização.

Recentemente Gasparotto *et al.* (33), observaram os efeitos do SFDPS como arcabouço *in vitro* para as células tronco mesenquimais de ratos. Este novo selante pode ser preparado e adequado de acordo com sua necessidade, permitindo o uso com fibrinogênio autólogo, homólogo ou heterólogo. Os resultados demonstraram que o SFDPS exibiu morfologia em teia capturando as CTMs e não demonstrou toxicidade às mesmas (33). A partir dos resultados

obtidos tornou-se um promissor arcabouço-candidato tridimensional, além de não transmitir doenças infecciosas veiculadas pelo sangue humano.

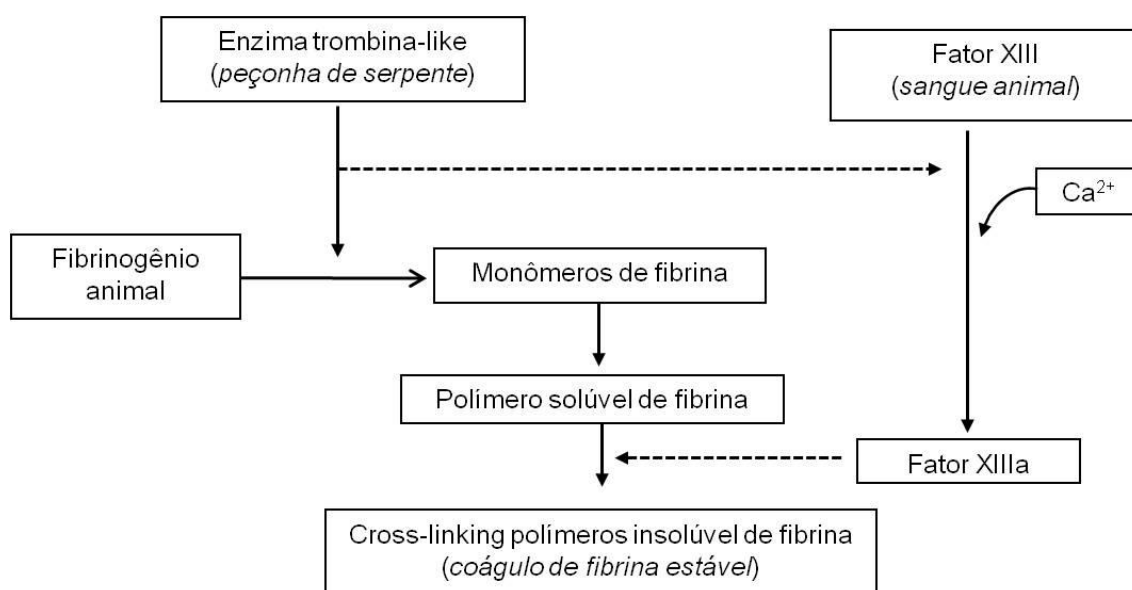


Figura 3: SFDPS mimetizando a etapa final da cascata de coagulação.(Desenvolvido por Barros et al.,(21) com algumas modificações.)

1.4- O uso de matrizes como arcabouços

Os arcabouços são conceitualmente relacionados e compreendem a modulação de domínios de interação, ordem e/ou suporte (34). Muitos arcabouços estão disponíveis e podem ser classificados como polímeros, plantas e algas, colagênio tipo I e fibronectina, alginato de algas marrons ou sintéticas, cálcio tri-fosfato (TCP), cerâmicas, polilácticos e poliglicolídeos, hidroxiapatita (HA) entre outros (34). Existem requisitos importantes para que uma substância possa funcionar como um bom arcabouço: 1) permitir e incentivar a adesão celular; 2) ser porosa para que as células tenham ligação com o arcabouço; 3) permitir que moléculas bioativas tenham acesso às células; 4) ser mecanicamente sensível ao sítio de inclusão e; 5) integrar-se perfeitamente ao novo tecido e ser absorvido sem nenhuma rejeição (34).

1.5 – Células tronco: uma terapia alternativa na recuperação de fígados cirróticos?

Nos últimos dez anos, o estudo das células tronco tem-se mostrado uma área bastante explorada nos diversos segmentos da ciência. Esse crescente interesse está relacionado às possibilidades que as células tronco oferecem em terapias celulares, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual. Destaca-se ainda o fato de poderem ser aplicadas em terapias para diversas doenças para as quais não há tratamento eficaz (35, 36, 37). Há uma variedade de terminologia para definir e classificar as células tronco. Elas possuem três características básicas, a saber: capacidade de auto-renovação; capacidade de uma única célula se diferenciar em outros tipos celulares, e capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (38).

De acordo com Abdallah *et al.*, (2008) e Horwitz *et al.*, (2005), as células tronco mesenquimais são capazes de se diferenciar em células do tipo mesodérmico e, possivelmente, em outros tipos celulares não mesodérmicos, tais como células neurais e hepatócitos (39,40).

O primeiro estudo sugerindo o papel de células tronco extra-hepáticas no reparo do fígado foi publicado em 1999 (41). Os autores utilizaram 2-acetilaminofluoreno para bloquear a proliferação dos hepatócitos nos ratos e induzir a proliferação de células ovas. Desde então, muitos trabalhos foram realizados para investigar o potencial das células tronco da medula óssea na restauração do tecido hepático.

Em 2010, Kim *et al.*, relataram que a terapia com células tronco da medula óssea melhorou os níveis séricos de albumina (42). Além disso, Saito *et al.*, no mesmo ano relataram a eficácia e segurança da terapia com as células tronco para pacientes com cirrose hepática alcoólica. Tais resultados confirmam a segurança e a eficácia desta terapia (43).

Recentemente Salama *et al* (44) estudaram 40 pacientes acometidos de hepatite C e com cirrose em estágio final. Destes, 20 pacientes receberam tratamento convencional e 20 receberam durante cinco dias uma infusão de fator estimulador de crescimento de granulócitos (G-CSF) seguido de uma infusão de células tronco mesenquimais autólogas pelas veias periféricas. Os autores concluíram para o grupo tratado com células tronco: a infusão por

veia periférica é tão eficaz quanto a infusão intra-hepática; havendo melhora da função hepática e da fibrose; a infusão de células tronco após G-CSF melhora a mobilização da albumina em duas semanas e a concentração de protrombina e alanina aminotransferase dentro de um mês. Estes autores recomendam baseado neste e em estudos prévios, a infusão de células CD34 e CD133 seguidas da infusão de células tronco mesenquimais após um e três meses de tratamento.

Deve ser salientado que as células tronco são uma nova esperança para estes pacientes com cirrose hepática em fase terminal. Entre as barreiras a ser vencidas nesta nova terapia estão principalmente: 1) onde e como aplicar as CTMs ?; 2) que arcabouço ajudaria a manter as células no local desejado?

Assim, estudos recentes em modelos de cirrose induzidas por hepatotoxinas demonstraram que as CTMs da medula óssea têm o potencial de inibir a morte de hepatócitos e estimular a regeneração do fígado através de um mecanismo parácrino (45, 46, 47). No entanto, dificuldades na coleta e no armazenamento de quantidades suficientes de hepatócitos e perda significativa de células após o transplante têm limitado o potencial desta terapia, (48). Assim, sugerem-se as seguintes alternativas: 1) injeção intra-hepática que por sua vez colocaria as células diretamente no fígado, dificultando a perda para outros órgãos pela corrente sanguínea; 2) uso de arcabouços que dificultaria ainda mais essa perda aderindo e mantendo essas células tronco completamente ao fígado.

O presente trabalho foi desenvolvido em cima de um modelo experimental de cirrose hepática, nos conhecimentos adquiridos previamente do efeito de arcabouço *in vitro* do SFDPS, na tentativa de biomarcação da serinoprotease e das CTMs e na avaliação da biodistribuição destes no tecido hepático.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a capacidade do SFDPS como arcabouço biológico para células tronco mesenquimais CTMs na regeneração de fígados cirróticos.

2.2 - Objetivos específicos:

- Induzir a cirrose hepática em *Rattus norvegicus* (Wistar) aplicando-se semanalmente a tioacetamida por meio de injeção intraperitoneal;
- Sinalizar a serinoprotease, um dos componentes do selante, com fluoróforo para posterior visualização em microscopia de fluorescência;
- Inocular no lobo hepático direito CTMs associadas com o SFDPS sinalizado para avaliar a eficácia do selante como arcabouço;
- Sinalizar CTMs, utilizando o kit Click-it® EdU para o rastreamento da sua dispersão e proliferação;
- Avaliar a eficácia do selante, utilizando o kit Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (A30006) para sinalizar a serinoprotease e assim monitorar a eficácia do mesmo como arcabouço.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados 20 ratos machos adultos pesando aproximadamente 250g da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério da ANILAB de Paulínia. Estes foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz / 12 horas de escuro), temperatura média de 23°C e receberam água e ração *ad libitum*. Cinco ratos machos filhotes com 10 dias de idade foram utilizados para coleta da medula óssea.

3.2 - Indução da cirrose hepática

A cirrose foi induzida por meio da administração intraperitoneal de tioacetamida (CH_3CSNH_2) (SIGMA, Brasil) conforme protocolo estabelecido por Said, et al., (49) com pequenas modificações. As doses foram administradas duas vezes por semana ao invés de três como preconizado no trabalho original. Além disso, o tempo de administração no presente trabalho foi maior, ou seja de 20 semanas. Os animais receberam doses de 200mg/kg diluídas em salina, pela via intraperitoneal, duas vezes por semana durante vinte semanas. Foram cinco ciclos de três semanas com tioacetamida e descanso de uma ao final de cada ciclo, conforme descrito na Tabela 1

Tabela 1 – Protocolo experimental de indução da cirrose hepática pela tioacetamida em *Rattus norvegicus*.

Indução de cirrose hepática	1° mês (11/2013)	2° mês (12/2013)	3° mês (01/2014)	4° mês (02/2014)	5° mês (03/2014)
Ratos (n=20)	20	20	20	20	20
Dose por dia	200mg/kg	200mg/kg	200mg/kg	200mg/kg	200mg/kg
Dose por semana	400mg/kg	400mg/kg	400mg/kg	400mg/kg	400mg/kg
Descanso	1 semana	1 semana	1 semana	1 semana	1 semana

3.3- Coleta de sangue

Foi coletado 1mL de sangue uma vez por mês por veia caudal de todos os animais. Após, o sangue foi centrifugado durante 25 minutos por 2.500 RPM para realização das análises bioquímicas.

3.4- Avaliação Bioquímica

A avaliação da função hepática foi realizada mensalmente pela dosagem dos seguintes marcadores bioquímicos: ureia, aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT), albumina, proteína-C-reativa (PCR), glicose e bilirrubinas totais (BT) (BIOCLIN). As dosagens foram realizadas por meio do analisador bioquímico automatizado BS-200 (Mindray), no Laboratório de Bioquímica, UNIPEX da Faculdade de Medicina da UNESP, *Campus* de Botucatu. A Tabela 2 a seguir resume estas informações.

Tabela 2 – Protocolo experimental da avaliação bioquímica dos *Rattus norvegicus*.

Avaliação Bioquímica	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Meses	AT	A1°MT	A2°MT	A3°MT	A4°MT	A5°MT	ST

AT= Antes do tratamento; A1°MT= Após 1° mês de tratamento; A2°MT= Após 2° mês de tratamento; A3°MT= Após 3° mês de tratamento; A4°MT= Após 4° mês de tratamento; A5°MT= Após 5° mês de tratamento; ST = Sem tratamento.

3.5 - Selante de Fibrina

O SFDPS foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP – CEVAP, cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (50,51) No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente.

3.6– Colheita, obtenção e isolamento das CTMs da medula óssea de *Rattus norvegicus*.

Este procedimento foi realizado de acordo com o protocolo utilizado previamente por Gasparotto *et al.* (32).

3.7 - Caracterização das células tronco mesenquimais

As CTMs de segunda passagem foram caracterizadas com os seguintes marcadores positivos de superfícies: CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54 conhecido também como ICAM – 1. Os marcadores negativos avaliados foram os seguintes: CD34, CD45, CD11b, RT1 AW2, CLASS RT1 A leitura dos marcadores foi confirmada pelo citômetro de fluxo (FACSDiva Version 6.2–BD), gentilmente cedido para uso pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (Unesp *Campus* de Botucatu)

3.8 - Biomarcação da serinoprotease

Para a marcação da serinoprotease foi utilizado o Kit comercial Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (A30006), que possui um éster tetrafluorophenyl (TFP), que permite sua ligação na região amino primária. Este marcador é capaz de sinalizar pequenas quantidades de proteínas (20 a 100 µg) e com peso molecular entre 12 e 150 KDa. Obteve-se ao final, uma proteína purificada contendo entre 60 e 90% de marcação.

Para a marcação foram utilizadas 100 µg da serinoprotease pura e liofilizada. Para confirmação e determinação da marcação, uma amostra da solução contendo a serinoprotease conjugada (sinalizada), foi mensurada com auxílio de um espectrofotômetro, determinando-se a absorbância da amostra nas faixas entre “A280” e “A494”. Feito isto, foram realizados os cálculos matemáticos, determinando-se a concentração em mg/mL, pela equação matemática fornecida pelo fabricante e que encontra-se descrita a seguir:

$$\text{Concentração de proteína (mg/mL)} = \frac{[A_{280} - 0.11(A_{494})] \times \text{fator de diluição}}{A_{280} \text{ de proteína a 1mg/mL}}$$

3.9 - Método Cirúrgico

Foram utilizados 20 animais submetidos ao protocolo de indução à cirrose subdivididos em 4 grupos, a saber:

Grupo branco: animais cirróticos para análise histológica (n=2)

Grupo SFDPS: animais cirróticos que receberam o SFDPS no lobo direito através de injeção intra-hepática (n=6)

Grupo CTM: animais cirróticos que receberam CTMs no lobo direito através de injeção intra-hepática (n=6)

Grupo SFDPS + CTMs: animais cirróticos que receberam CTMs + SFDPS no lobo direito através de injeção intra-hepática (n=6).

Os animais foram colocados em contentores de ratos (Figura 4) e receberam anestesia inalatória com isoflurano (figura 4A). Durante a anestesia foi realizada uma incisão próxima à linha média do animal, expondo-se o lóbulo direito do fígado, aplicando-se a seguir o tratamento selecionado para cada grupo (Figura 5).

Após a aplicação dos produtos, de acordo com o grupo selecionado, a incisão foi suturada e os animais receberam anti-inflamatório Carprofeno na dosagem de 0,05/Kg de peso e antibiótico Enrofloxacina na dosagem de 0,01/kg de peso. Foram a seguir alojados no Biotério onde permaneceram entre 15 e 30 dias. A seguir, de acordo com o protocolo, foram eutanasiados com doses letais de xilazina e Ketamina nos dois períodos respectivamente, sendo nove animais do período de 15 dias e nove animais no período de 30 dias. Os fígados foram removidos e mantidos em solução de formaldeído tamponado a 10% para avaliação histológica e imunoistoquímica.

3.10 – Processamento do material

Os fígados foram acondicionados em tubos de vidro devidamente identificados. Para conservação do órgão, os mesmos foram mantidos em formaldeído tamponado a 10%. Posteriormente os tecidos foram preparados para o emblocamento. Nesta etapa o tecido foi colocado duas vezes em álcool a 100% durante uma hora cada. Após, esse álcool foi descartado e o tecido foi colocado em álcool + xilol durante 20 minutos. Após isto o álcool + xilol foram descartado e o tecido foi colocado em xilol com duas repetições durante mais 20 minutos cada.

Os tecidos foram colocados em três parafinas, durante uma hora cada. Após o material foi colocado na caixa para emblocar com parafina líquida e dentro de uma hora os blocos já estavam prontos. Após emblocados, foram realizados os cortes de 5 µm no micrótomo (Leica) gentilmente disponibilizado pelo Laboratório de Morfologia do Instituto de Biociências (IBB) da Universidade Julio Mesquita Filho (UNESP) de Botucatu. Posteriormente foi

retirada a parafina com xilol e álcool e a seguir hidratados com álcool e xilol. Posteriormente as amostras foram submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (HE) e picrosirius para a análise morfológica do fígado. As lâminas histológicas foram observadas no microscópio óptico com aumento da objetiva entre 5x e 20x.

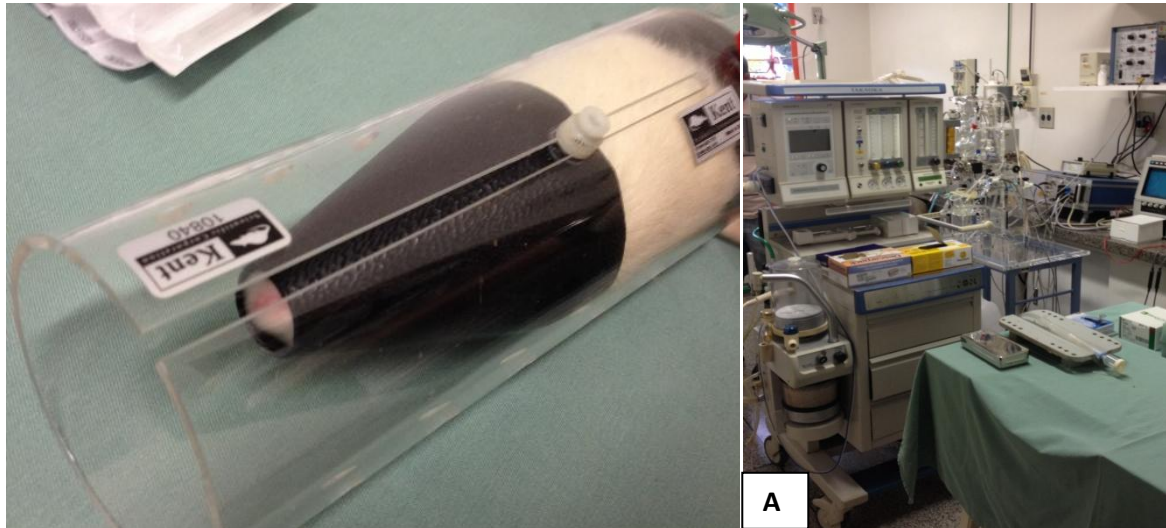


Figura 4: Modelo de contendor de ratos para auxiliar na anestesia e na coleta de material. **A:** Aparelho de anestesia inalatória para animais.

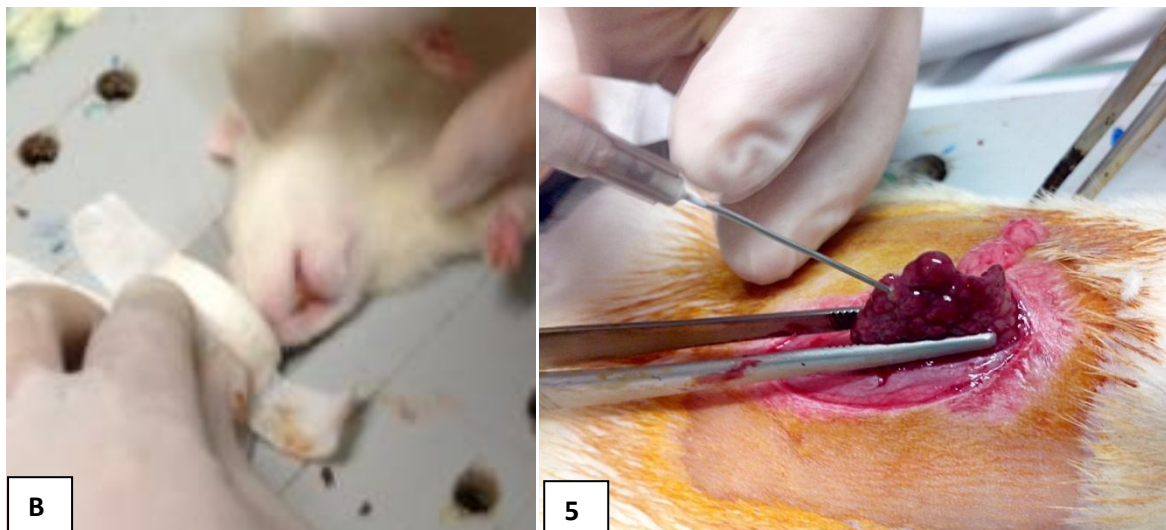


Figura 4B: *Rattus norvegicus* anestesiado após 20 semanas de tratamento com tioacetamida para aplicação do tratamento selecionado.

Figura 5: Aplicação do tratamento selecionado no lobo direito do fígado 20 semanas após o tratamento com tioacetamida.

3. 11 – Rastreamento das células tronco mesenquimais

Para imunomarcção os cortes do fígado foram preparados em lâminas silanizadas e desparafinizadas de acordo com protocolo do fabricante do Kit Click-iT® EdU Imaging Kits.

3.12 – Comitê de Ética

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, protocolo CEEA 956/2012, número 35.

3.13– Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o teste Wilconxon

4 – RESULTADOS

4.1 – Cirrose induzida pela tioacetamida

Após 20 semanas de tratamento com a tioacetamida, observou-se o fígado *in vivo*, observando-se vários nódulos de regeneração, sugerindo que a indução da cirrose por esta droga foi eficaz (Figura 6).

As análises bioquímicas demonstraram aumento nas taxas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) nos dois primeiros meses, ocorrendo uma redução destas no terceiro mês. No quarto mês observou-se novamente aumento seguido de uma redução a partir dos quinto e sexto meses. A figura 7 demonstra estas alterações.



Figura 6: Cirurgia realizada após 20 semanas de tratamento com tioacetamida para demonstração dos vários nódulos de regeneração.

A figura 8 demonstra o perfil da ureia e da glicose durante a indução da cirrose pela tioacetamida. Houve pequena variação nos níveis de ureia, decaindo a partir do terceiro mês. A glicose variou pouco, entretanto aumentou consideravelmente no sexto mês do experimento.

E a figura 9 demonstra o perfil da albumina (g/dL), proteína C reativa (mg/L) e bilirrubina total (mg/DL) durante a indução da cirrose pela tioacetamida. Não havendo pouca alteração.

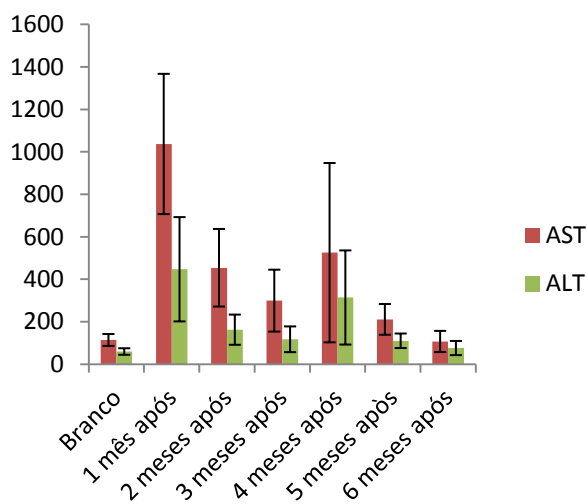


Figura 7: Perfil bioquímico do aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) (U/L) durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.

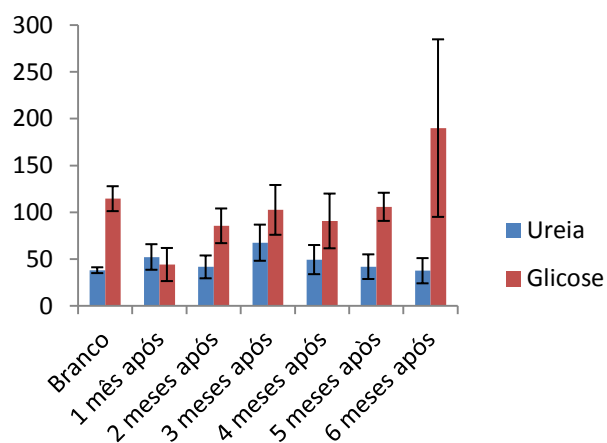


Figura 8: Perfil bioquímico de ureia e glicose (mg/dL), durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.

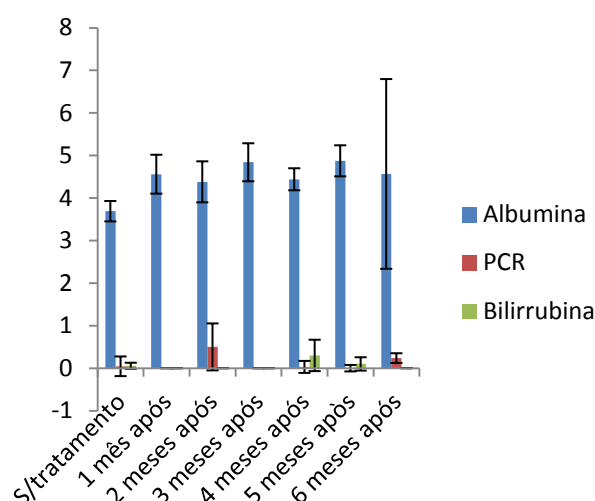
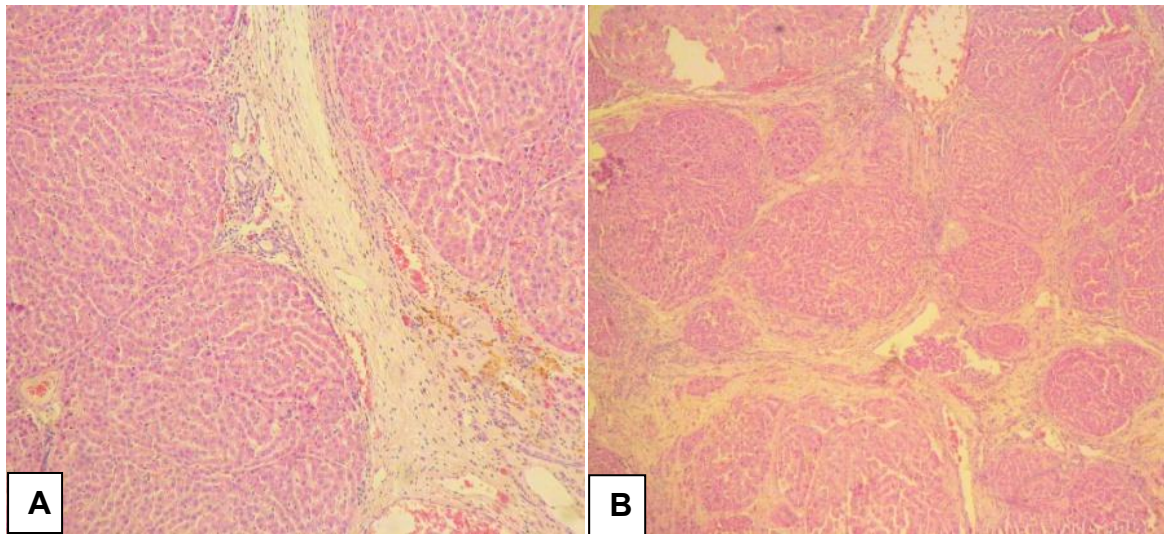


Figura 9: Perfil bioquímico de albumina (g/dL), proteína C reativa (mg/L) e bilirrubina total (mg/DL) durante a indução da cirrose pela tioacetamida com duração de 20 semanas.

Tabela 3 – Distribuição das medianas e dos valores máximos e mínimos obtidos das análises bioquímicas de Ureia, AST, ALT, albumina, PCR, glicose e bilirrubinas, realizadas antes e durante a indução da cirrose.

Bioquímico	Sem indução	1 mês de indução	2 meses de indução	3 meses de indução	4 meses de indução	5 meses de indução	1 mês pós indução
Ureia	38.0(32,5-43,0)	54.0(29.3-84.2)	42.2(26.6-77.5)	68.9(38.9-110.5)	48.9(28.8-102.8)	41.7(17.6-75.5)	41.7(16.2-63.6)
		B	A	B	B	A	A
AST	114.0(57,6-152,1)	962.4(370.3-3611.7)	445.0(187.6-770.9)	302.4(151.5-746.6)	529.6(109.1-1547.1)	213.8(101.2-371.0)	213.8(101.2-371.0)
		B	B	B	B	B	B
ALT	59.6(44,5-109,8)	460.7(121.3-1546.2)	161.9(57.5-344.7)	120.1(44.4-271.4)	367.4(71.0-713.7)	367.4(71.0-713.7)	100.8(58.5-182.7)
		B	B	A	B	B	B
Albumina		4.6(4.1-6.0)	4.4(3.9-5.5)				4.7(4.0-5.1)
	3.7(3,0-4,0)	B	B	4.9(3.8-5.7)	4.5(4.0-5.0)	4.9(4.2-5.6)	B
PCR		0.0(0-0)	0.5(0.0-1.5)	0.0 (0-0)	0.0(0-0.4)	0.0(0-0.4)	
	0.0(0,0-0,7)	B	B	1.0 B	A	B	0.0(0-0.4) A
Glicose		44.7(23.3-73.8)	85.6(56.3-117.1)	103.0(11.9-140.1)	90.9(8.3-121.4)	106.0(77.4-132.6)	118.9(95.5-136.2)
	114.5(99,4-142,8)	B	B	B	B	B	A
Bilirrubina		0.0(0-2)	0.0(0-0)	0.0(0-0)	0.4(0-1.1)	0.1(0-0.5)	
	0.0(0,0-0,2)	A	B	B	B	B	0.1(0-0.2) B

A= ausência de diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) pelo teste de Wilcoxon; B= diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) pelo teste de Wilcoxon.



As análises histológicas demonstram a efetividade do tratamento com tioacetamida, como demonstram as figura 10 e 11

Figura 10AB: Análise histológica do fígado dos animais do grupo branco após tratamento com tioatemaída durante 20 semanas. **A:** Feixe de fibrose. **B:** Nódulos com feixe de fibrose. Avaliação pela coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) aumento de 20X.

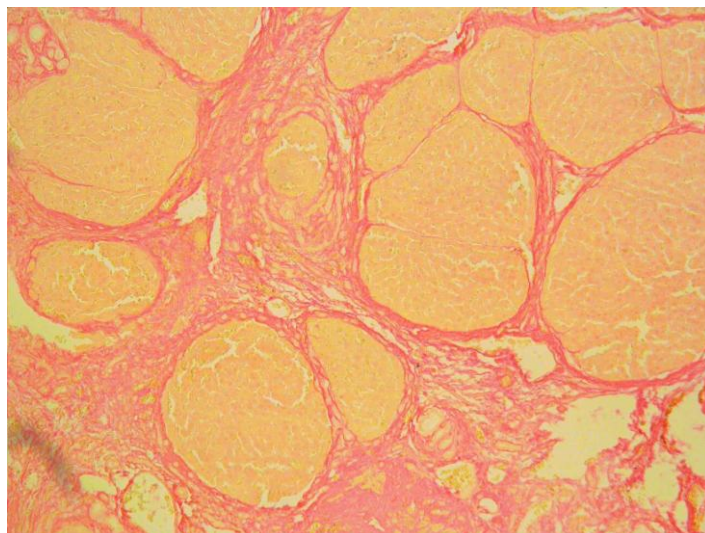


Figura 11: Análise histológica do fígado dos animais do grupo branco após tratamento com tioatemaída por 20 semanas observando-se nódulos com feixe de fibrose. Avaliação pela coloração Picrosirius Red. aumento 20x.

4.2 – Análise das CTMs por Citometria de fluxo

As células obtidas a partir do cultivo primário, provenientes da região em que houve formação do anel que representa a concentração da fração de células tronco mesenquimais da medula óssea dos ratos, apresentaram morfologia fibroblastóide (figura 12). Essas observações foram indicativas de que se tratavam de CTMs, sendo confirmado posteriormente com a marcação pelos anticorpos RT1 AW2 FITC, CLASS RT1 PE, CD11b, CD44, CD90, CD34, CD105, CD73, CD45, ICAM 1 (figura 1 a 13 em anexo).

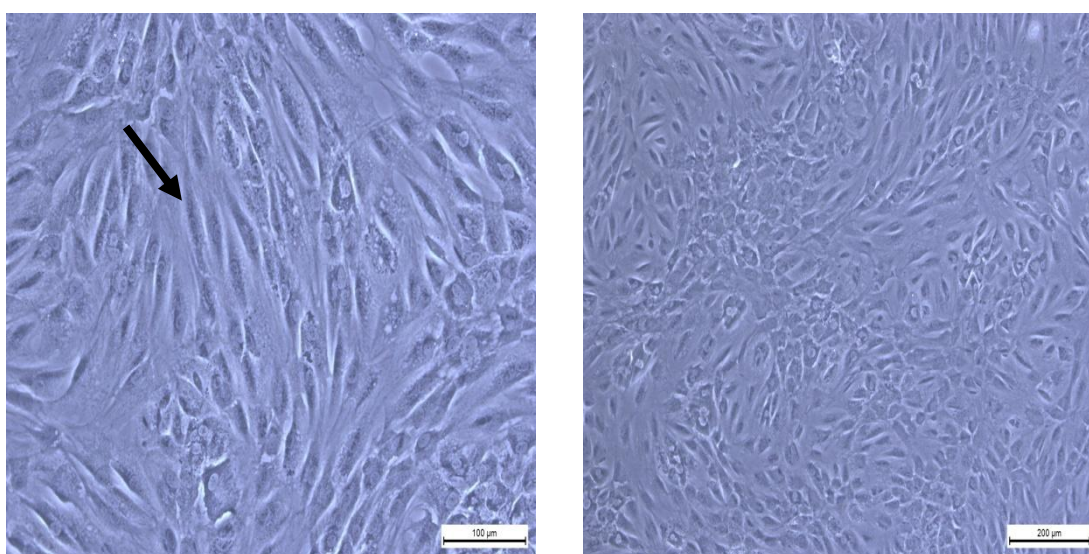


Figura 12: Morfologia fibroblastóide (seta preta) característica das CTMs, observadas em microscopia óptica de luz invertida. MO (200X).

A marcação foi realizada em cultivo celular de segunda passagem (Anexos 1, 2 e 3). Os resultados provenientes da citometria de fluxo revelaram-se com marcação baixa para os marcadores RT1 AW2 FITC (27,1%) (Anexo4); CLASS II RT1 PE (34,2%) (Anexo 5) e CD11b com 3,4% de células marcadas (Anexo 6). Os seguintes marcadores tiveram marcação média: CD44, 55,0% das células marcadas (Anexo7), e CD34, com 56,0% das células marcadas (Anexo 8). A marcação elevada foi obtida para os seguintes marcadores CD105, (93,9%) (Anexo 9); CD73, (71,3%) (Anexo 10); CD45,(76,5%) (Anexo 11) CD90, (98,2%) (Anexo 12) e ICAM 1 também conhecido como CD54 onde obteve-se 99,0% das células marcadas (Anexo 13).

Tabela 4 – Resultados da marcação celular observada na citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Empresa	Diluição	Resultado
RT1 AW2	ab119770	ABCAM	1/100	27,1%
CLASS II RT1	ab111825	ABCAM	1/100	34,2%
CD11b	ab33816	ABCAM	1/100	3,4%
CD44	ab23396	ABCAM	1/100	55,0%
CD34	ab187284	ABCAM	1/100	56,0%
CD105	ab11414	ABCAM	1/100	93,9
CD73	551123	BD	1/100	71,3%
CD45	ab33916	ABCAM	1/100	76,5%
CD90	ab226	ABCAM	1/100	98,2%
ICAM1ou CD54	ab23835	ABCAM	1/100	99,0%

4.3 – Biomarcação da serinoprotease utilizada no selante de fibrina

Os resultados encontrados na análise de espectrofotometria foram de 68 µg (0,068 mg/mL), o que corresponde a 68% dos 100 µg da serinoprotease utilizados inicialmente e conjugadas por meio do uso do kit comercial, com concentração final de $22,67 \times 10^6$ M. Esse valor foi encontrado utilizando-se a equação de cálculo, descrita anteriormente, e disponibilizada pelo protocolo do kit.

Na análise da fluorescência utilizamos a microscopia de fluorescência para observamos a sinalização da serinoprotease como demonstrado na figura 13, sinalizada por seta.

Na análise de microscopia confocal foi observado no fígado dos animais eutanasiados, após 2 e 3 dias de inoculação do selante contendo serinoprotease sinalizada pontos mais intensos de fluorescência na coloração verde demonstrando a mesma no tecido hepático, tanto no lobo direito, onde foi realizado o tratamento, quanto, no esquerdo, onde este não foi feito (Figura 14 A e B a 15 A e B).

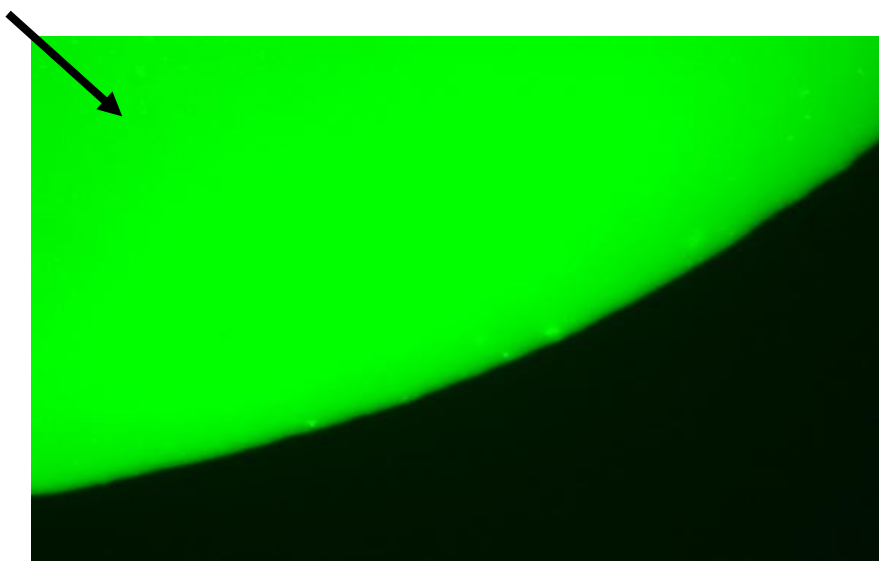


Figura 13: Serinoprotease conjugada com Alexa Fluor 488 Microscale Protein Kit (A30006 – Lifetechnologies), emitindo fluorescência (ex/em: 494/519nm), serinoprotease sinalizada pela coloração verde.

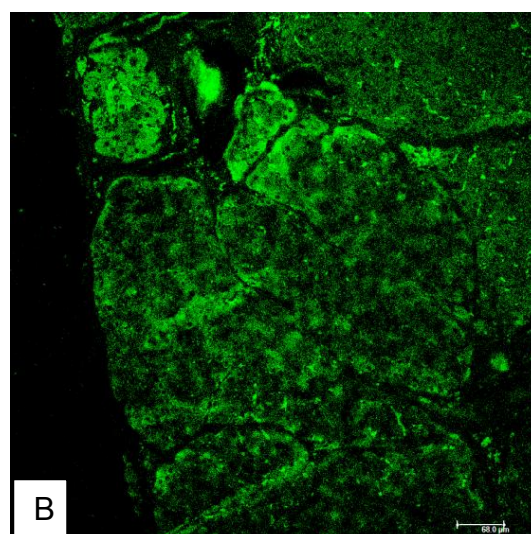
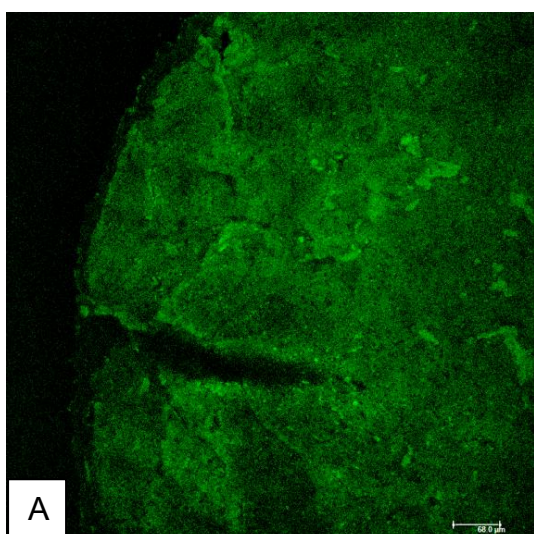


Figura 14AB: **A:** Lobo direito de animal eutanasiado após dois dias de cirurgia, demonstrando pela coloração verde a presença da serinoprotease marcada. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde. **B:** Lobo esquerdo do mesmo animal, também demonstrando a presença da serinoprotease marcada pela coloração verde. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde.

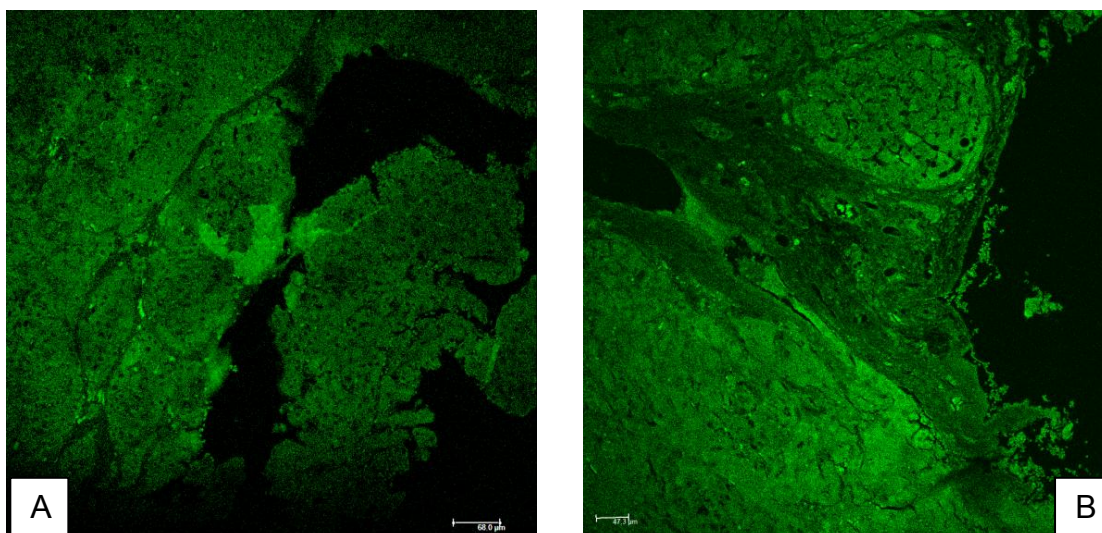


Figura 15AB: **A:** Lobo direito de animal eutanasiado após três dias de cirurgia demonstrando pela coloração verde a presença da serinoprotease marcada. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde. **B:** Lobo esquerdo do mesmo animal, também demonstrando a presença da serinoprotease marcada. Serinoprotease sinalizada pela coloração verde.

Na microscopia confocal quantificamos a marcação da serinoprotease. Para tanto selecionamos áreas aleatórias e observamos a diferença dos picos de autofluorescência própria do tecido e da marcação pela serinoprotease (Figura 16, 17 e tabela 5).

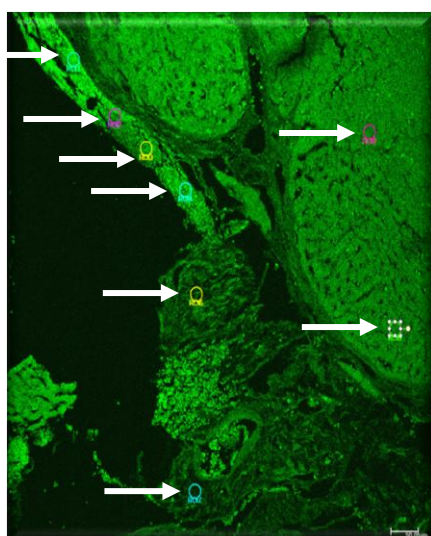


Figura 16: Análise de quantificação na microscopia confocal demonstrando a seleção dos pontos escolhidos aleatoriamente para observação dos diferentes picos de fluorescência, ratificado na figura 17.

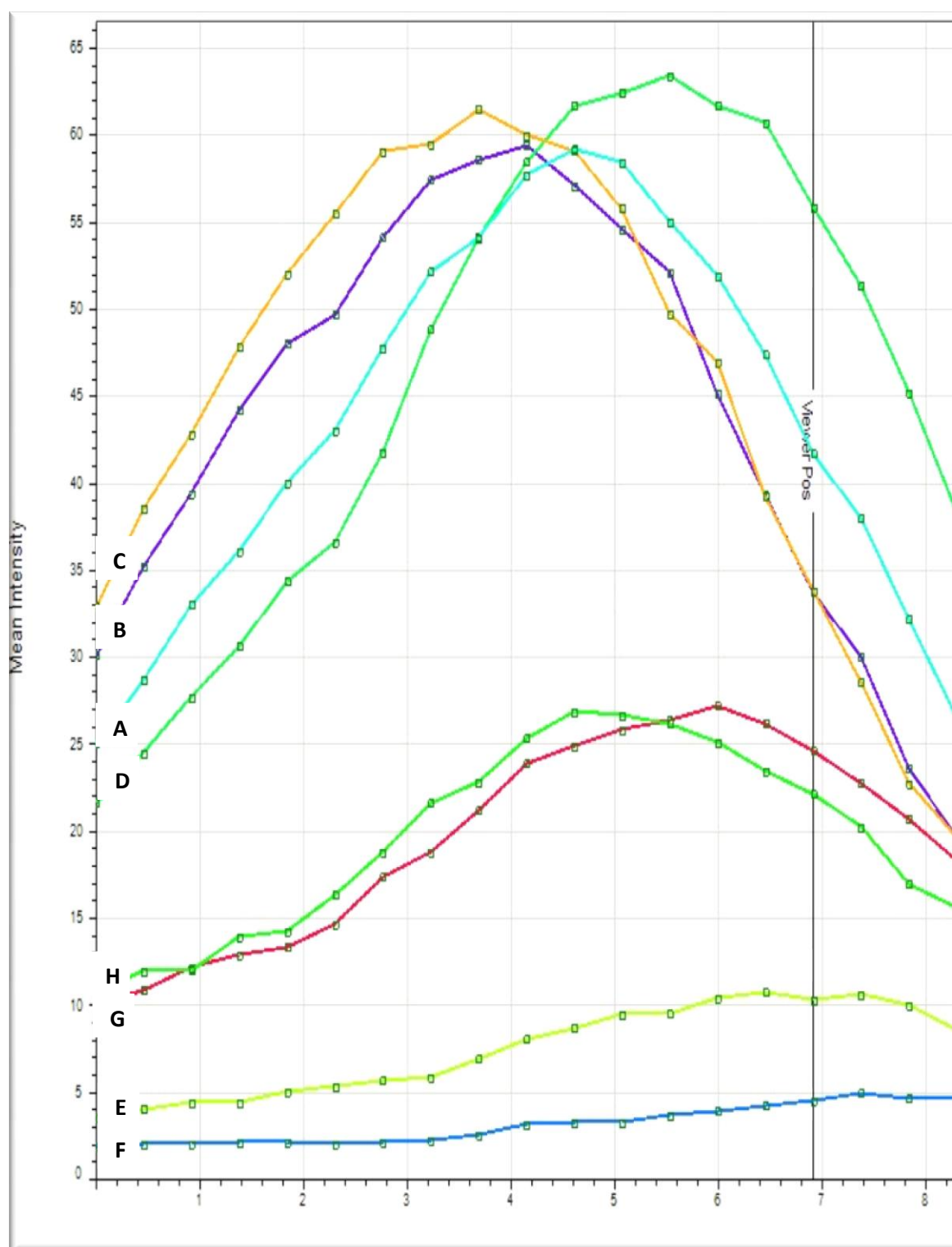


Figura 17: Demonstração dos diferentes picos de fluorescência, demonstrando a diferença da autofluorescência do tecido e sinalização da serinoprotease. Seleção dos pontos de A a H. A a D: Picos da serinoprotease sinalizada; E a H: Picos de autofluorescência do tecido.

Tabela 5 – Distribuição dos parâmetros estáticos do fígado demonstrando a diferença entre marcação da proteína e autofluorescência do tecido.

184	ROI1(A)	ROI2(B)	ROI3(C)	ROI4(D)	ROI5(E)	ROI6(F)	ROI7(G)	ROI8(H)
Média	43,807	39,654	41,207	40,123	7,321	3,256	18,822	18,462
DP	14,545	15,564	16,532	13,684	2,442	1,099	5,761	5,731
MA	63,377	59,396	61,474	59,155	10,733	4,959	27,188	26,815
MI	21,586	11,533	11,735	15	3,49	1,854	10,067	10,179

184 – Numeração do lobo do fígado; ROI: Nome dos pontos selecionados dado pelo aparelho de microscopia confocal; DP – Desvio Padrão. MA: Máxima da autofluorescência encontrada no pico; MI: Mínima da autofluorescência encontrada no pico.

4.4 - Análises da Imunomarcação

A imunomarcação demonstrou, 15 dias após a cirurgia e aplicação do SFDPS + CTMs, a presença das CTMs tanto no lobo direito, onde foi feito o tratamento, quanto no esquerdo, que não recebeu tratamento. Foi evidenciada a presença das CTMs em dois lobos direito de três animais e em um lobo esquerdo de um deles (Figuras 18 A e B, 22 e 23, e Tabela 6).

No grupo tratado apenas com CTMS e eutanasiado após 15 dias não se observou a presença das células em nenhum dos lobos estudados (Figuras 19A e B, 22 e 23 e Tabela 6).

A imunomarcação demonstrou, 30 dias após a cirurgia e aplicação do SFDPS + células tronco, a presença das CTMs tanto no lobo direito, onde foi feito o tratamento, quanto no esquerdo, que não recebeu tratamento. Foi evidenciada a presença das CTMs em dois lobos direito de três animais e em um lobo esquerdo de um deles (Figura 20 A e B, 24 e 25 e Tabela 6).

No grupo tratado apenas com CTMS e eutanasiado após 30 dias observou-se a presença das CTMS tanto no lobo direito quanto no esquerdo. Foi evidenciada a presença das CTMs em dois lobos direito de três animais e em um lobo esquerdo de um deles (Figuras 21 A e B, 24 e 25 e Tabela 6).

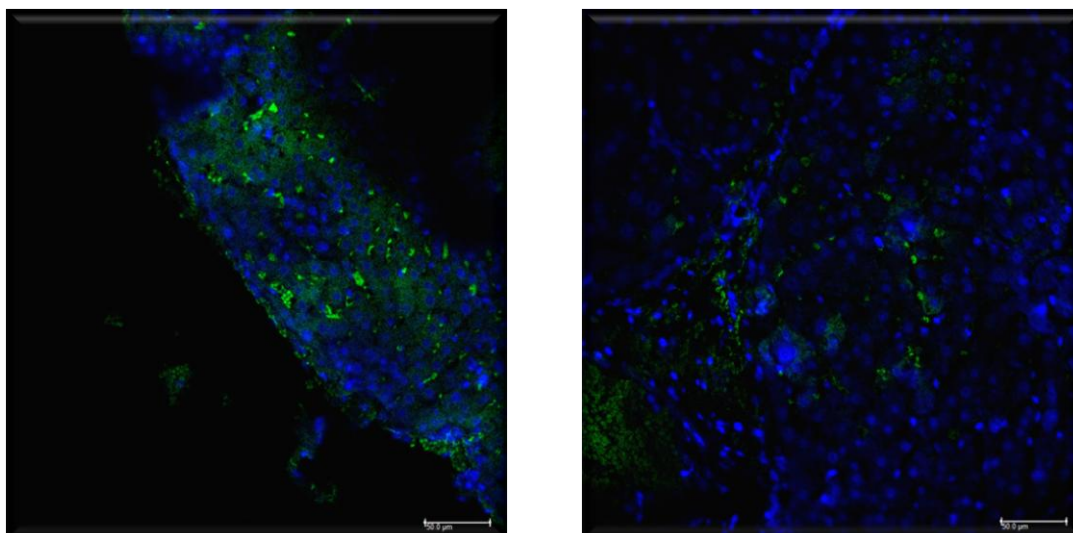


Figura 18AB: Demonstração da presença das CTMs pela análise da microscopia confocal após 15 dias de cirurgia no grupo SFDPS + CTMs. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. **A:** Lobo direito com presença de CTMs. **B:** Lobo esquerdo com presença de CTMs.

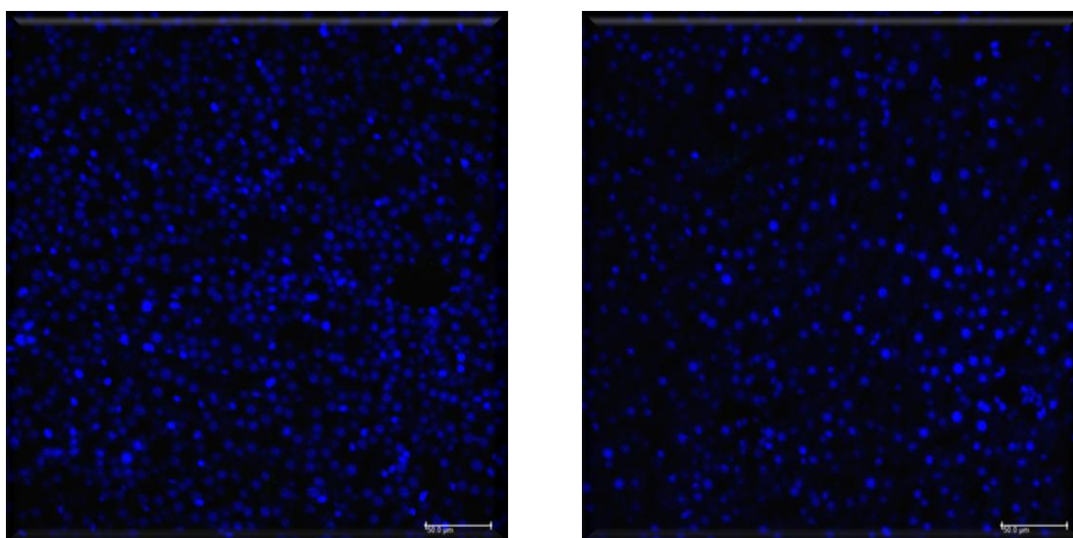


Figura 19AB: Demonstração da ausência das CTMs pela análise da microscopia confocal após 15 dias de cirurgia no grupo CTMs. O azul marcou o DNA celular e o as CTMS marcadas em verde com o kit EDU não foram observadas. **A:** Lobo direito com ausência de CTMs. **B:** Lobo esquerdo com ausência de CTMs.

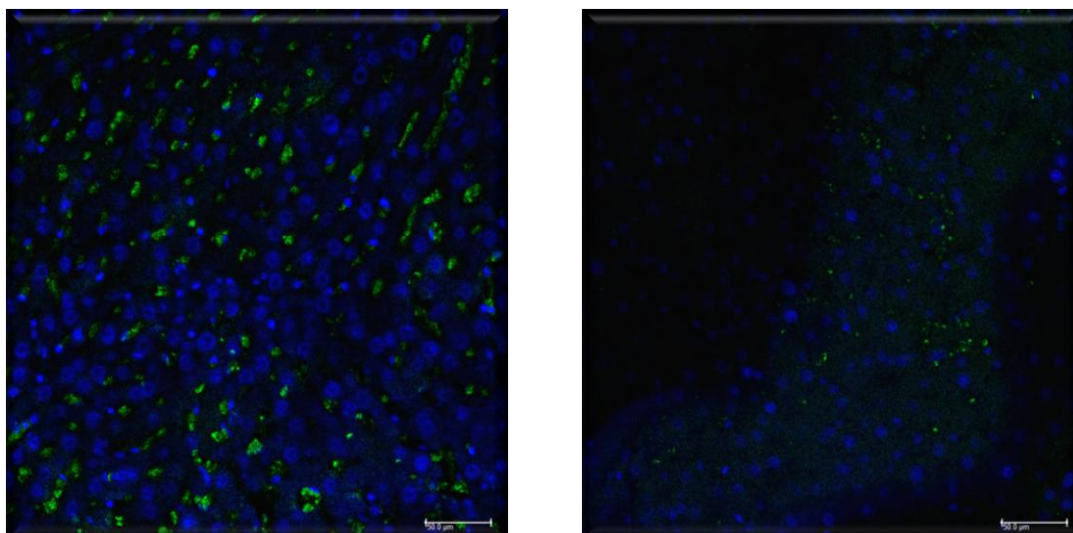


Figura 20AB: Demonstração da presença da CTMs pela análise de microscopia confocal após 30 dias de cirurgia no grupo SFDPS + CTMS. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. **A:** Lobo direito com presença de CTMs. **B:** Lobo esquerdo com presença de CTMs.

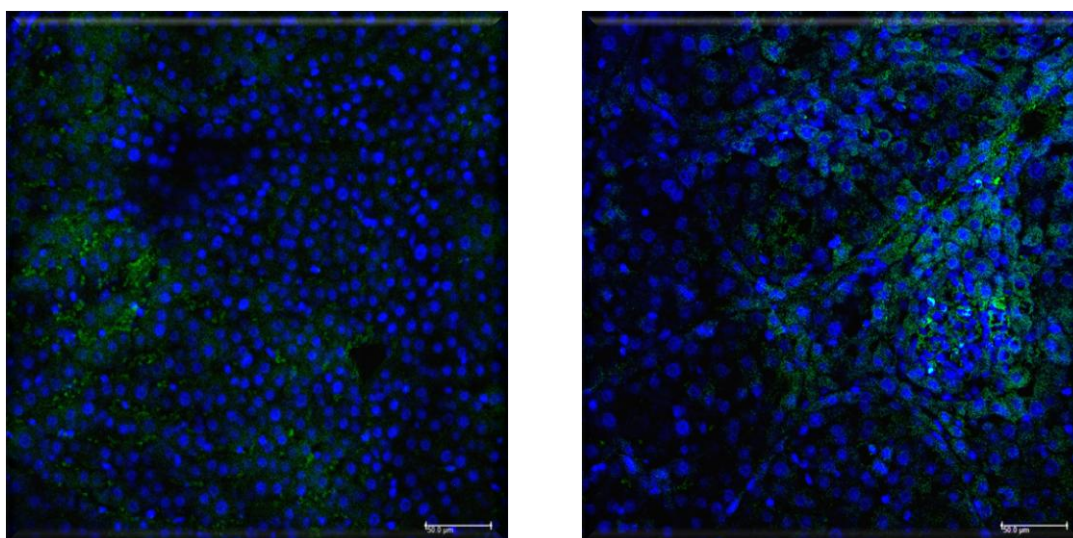


Figura 21AB: Demonstração da presença da CTMs pela análise de microscopia confocal após 30 dias de cirurgia no grupo CTMS. O azul marcou o DNA celular e o verde corresponde a proliferação das CTMs marcadas com kit EDU. **A:** Lobo direito com presença de CTMs. **B:** Lobo esquerdo com presença de CTMs.

Tabela 6 – Análise da fixação e da migração das CTMs nos lobos direito e esquerdo após a aplicação com ou sem SFDPS aos 15 e 30 dias de observação.

15 dias	Fixou CTMs				15 dias	Migrou CTMs		
	Não	Sim	%			Não	Sim	%
Sem selante	3	0	0%		Sem selante	3	0	0%
Com selante	1	2	66%		Com selante	2	1	33%
Total	3	3			Total	3	3	
p = 0,400					p = 1,000			
30dias	Fixou CTMs				30dias	Migrou CTMs		
	Não	Sim	%			Não	Sim	%
Sem selante	1	2	66%		Sem selante	2	1	33%
Com selante	0	3	100%		Com selante	1	2	66%
Total	3	3			Total	3	3	
p = 1,000					p = 1,000			

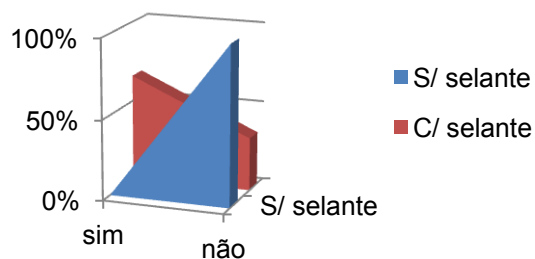


Figura 22: Fixação das CTMs do lobo direito do fígado após 15 dias de tratamento com ou sem selante.

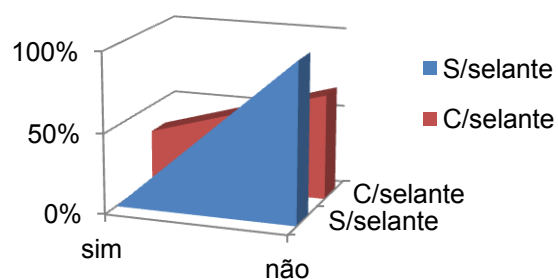


Figura 23: Migração da CTMs do lobo direito para esquerdo do fígado após 15 dias de tratamento com ou sem selante.

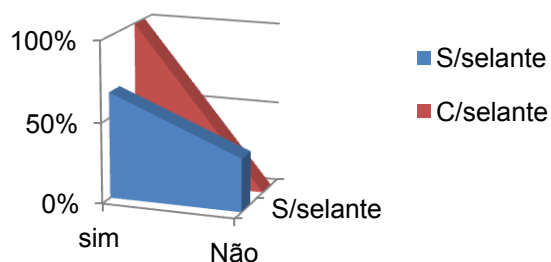


Figura 24: Fixação das CTMs no lobo direito do fígado após 30 dias de tratamento com ou sem selante.

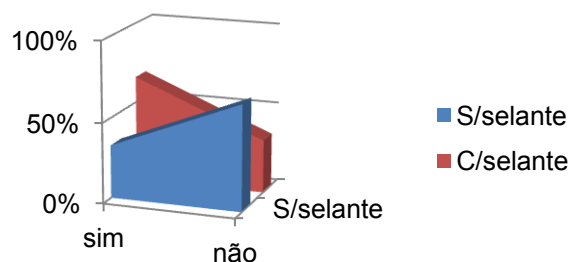


Figura 25: Migração da CTMs do lobo direito para esquerdo do fígado após 30 dias de tratamento com ou sem selante.

5 – DISCUSSÃO

O tratamento específico da cirrose hepática é um dos grandes desafios a ser vencido pelos gastroenterologistas (3,53). Assim, o desenvolvimento e a padronização de modelos experimentais foram imperativos para a evolução da ciência mundial nesta área. Um deles, o preconizado por Wang *et al*, na qual utiliza o tetracloreto de carbono como droga indutora, não foi possível reproduzi-lo, uma vez que todos animais não desenvolveram cirrose hepática após 20 semanas de tratamento conforme protocolo padronizado (54). Tentou-se então o proposto por Said *et al*, (49) que utiliza a tioacetamida como droga indutora de cirrose. Apesar de não se ter seguido rigorosamente o protocolo preconizado os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos na literatura (13; 55, 56, 57).

A tioacetamida mostrou-se eficiente, causando alterações bioquímicas e induzindo danos celulares compatíveis com cirrose hepática. Foi possível demonstrar macro e micronódulos, intensa fibrose além de infiltrado inflamatório conforme mostrado na Figura 6. Estes resultados demonstram que os objetivos de se reproduzir um modelo experimental de cirrose em ratos, previamente descrito na literatura, foram atingidos. Deve ser salientado, entretanto, que a dose de 200mg/kg administrada três vezes por semana foi reduzida para apenas duas vezes por semana. Esta conduta foi necessária, haja vista que muitos animais morreram durante o processo e corríamos o risco de chegar ao final do protocolo preconizado sem animais cirróticos. Estas observações necessitam ser descritas detalhadamente uma vez que a reprodutibilidade do método por outros pesquisadores interessados deve ser possível, real e factível. Outro desafio a ser vencido é o de que o fígado dos animais não pode entrar em falência. Ou seja, deve existir um ponto ideal de inflexão e recuperação, caso contrário os animais não sobreviverão ao experimento pretendido, não atingindo assim os objetivos finais da proposta.

No âmbito dos exames laboratoriais subsidiários, alguns parâmetros bioquímicos foram utilizados para demonstrar a evolução da cirrose. De acordo com Finco *et al.*, 1997 (58) a ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia produzida pelas bactérias intestinais urease positivas. A síntese da ureia diminui no estágio terminal de doenças hepáticas graves, tais como na cirrose.

Isso ocorre pela falência dos hepatócitos em sintetizar diferentes moléculas, incluindo a ureia. No presente estudo pudemos observar pequena diminuição de síntese de ureia, não significativo, mas suficiente para demonstrar instabilidade do sistema. Isso demonstra que os animais apesar de cirróticos não estavam ainda no estágio avançado e final da doença. Trata-se de importante constatação, haja vista que o estudo prevê a aplicação de células tronco na tentativa de reverter o processo de cirrose. Caso os animais estivessem em fase final da doença este processo seria impossível de ser viabilizado. Concluímos novamente que o modelo experimental desenvolvido e reproduzido a partir da literatura, atendeu perfeitamente aos objetivos do projeto.

É sabido da literatura que as aminotransferases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão presentes em níveis normais, no soro dos seres humanos e dos animais. Quando ocorrem lesões hepatocelulares, tanto virais, quanto tóxicas, estas se elevam significativamente. No presente projeto o maior pico observado da AST foi de 1.000 U/L e o maior da ALT de 480 U/L que aconteceram durante o primeiro mês de tratamento. No sexto mês estes valores diminuíram para 150 U/L e 130 U/L respectivamente. Estas observações mais uma vez confirmam a de outros autores (59) e reafirmam o desenvolvimento de um modelo experimental adequado de cirrose. Como a ALT e AST são marcadores funcionais para a cirrose hepática, em especial a ALT, a diminuição de ambas significa o início do esgotamento da capacidade hepática de metabolização. Este momento crítico é difícil de ser diagnosticado, uma vez que se o fígado entrar definitivamente em falência, qualquer tipo de tratamento será a partir de então ineficaz.

A albumina é sintetizada pelo retículo endoplasmático rugoso ou mais precisamente pelos ribossomos aderidos dos hepatócitos, possuindo uma vida média em torno de duas semanas. Como a meia-vida desta molécula é relativamente longa, a redução da síntese pelo fígado pode demorar vários dias para se manifestar clínica e laboratorialmente (60). No nosso modelo não foi observada essa redução. Acredita-se que isso pode ter ocorrido por dois motivos, a saber: o primeiro é que a meia vida da albumina é relativamente alta podendo demorar muito tempo para que as dosagens baixas fossem

observadas e a segunda é que os animais, apesar de cirróticos, ainda não se encontravam em estágio terminal da doença. Esta situação foi altamente desejável para a continuidade do experimento.

De acordo com Póvoa *et al.*, (1998) e, Lobo (2012) a proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado e liberada rapidamente após o início de um processo inflamatório ou lesão tecidual orgânica. O que determina sua concentração sérica é a taxa de síntese, que depende, por sua vez, da intensidade do estímulo inflamatório (61,62). No presente estudo as variações da PCR foram discretas em decorrência possivelmente do fato dos animais, apesar de cirróticos, não se encontrarem em estágio final da doença. É possível que a cirrose hepática não tenha estímulo agudo suficiente agudo para causar o aumento de síntese deste marcador.

O fígado atua na regulação da disponibilidade de energia metabolizando carboidratos e lipídeos provenientes da glicose e dos corpos cetônicos. Considerando que importantes vias do metabolismo proteico ocorrem no fígado e que a desnutrição proteicoenergética (DPE) é altamente prevalente nos pacientes cirróticos, autores sugerem que a DPE levaria à deterioração mais rápida da função hepática, (63, 64, 65). No presente estudo observamos aumento deste carboidrato no sexto mês de experimento. É possível, demonstrar, que os animais apesar de cirróticos, ainda eram portadores de importante reserva hepática, situação também desejável como já descrito anteriormente.

A determinação da bilirrubina total confirma e avalia o grau de icterícia, bem como fornece índices para acompanhamento (59). Nas doenças hepáticas graves, em especial nas hepatites virais e na cirrose hepática, o metabolismo do pigmento biliar encontra-se prejudicado simultaneamente em diversos locais do fígado. Assim, ocorre aumento tanto da fração direta, quanto da indireta (57, 66). No presente estudo as dosagens deste pigmento não se alteraram significativamente mostrando mais uma vez que os animais, apesar de cirróticos, ainda não se encontravam no grau avançado da doença.

No âmbito das análises anatomopatológicas foi possível se observar macroscopicamente alterações compatíveis com cirrose hepática. É sabido que o fígado do *Rattus norvegicus* possui seis lobos hepáticos. Durante o ato

cirúrgico foi possível observar em todos animais um fígado multilobulado, como pode ser observado em detalhe na figura 5 e 6. As análises histológicas realizadas, por meio de duas colorações, confirmaram os achados macroscópicos e laboratoriais. O conjunto destas observações foram corroboradas pelas publicações de Salgado et al., 2000 e Sato et al., 2004 (68,69) e confirmam a presença de cirrose no modelo experimental em apreço.

As CTMs de segunda passagem foram caracterizadas por meio da citometria de fluxo com cinco marcadores positivos de superfície (CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54 conhecido também como ICAM – 1) e cinco negativos (CD34, CD45, CD11b, RT1 AW2, CLASS RT1). De acordo com Oswald *et al.*, 2004 (70) as CTMs se apresentam *in vitro* como uma população homogênea de células aderentes que expressam proteínas específicas em sua superfície, também denominados marcadores de membrana, que incluem CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54 também conhecido como ICAM -1. O presente trabalho está de acordo com esses dados e com a literatura (33, 69) uma vez que quatro marcadores positivos acima citados tiveram taxas de reatividade média e alta como descrito nos resultados.

A biomarcação da serinoprotease utilizada no SFDPS foi tentada pela primeira vez neste trabalho. Isso foi realizado para se poder observar a biodistribuição do selante, já que o mesmo depende da concentração dos seus componentes para formar um coagulo rápido e estável na temperatura dos tecidos. Esta iniciativa foi necessária, uma vez que poderia auxiliar na avaliação da capacidade do selante atuar como arcabouço para células tronco no fígado. Assim, objetivou-se aplicar diretamente no parênquima hepático as células tronco mesenquimais juntamente com o selante e avaliar a permanência de ambos por tempo suficiente para implantação das células.

Os resultados demonstraram por meio de cálculo matemático sugerido pelo produtor do Kit comercial Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (A30006) e comprovados pela microscopia de fluorescência confocal que a marcação da serinoprotease foi eficiente, obtendo-se 68% de marcação, ou seja, dois terços da massa empregada. A microscopia confocal comprovou sua marcação também no tecido hepático, onde a enzima marcada foi misturada com os demais componentes do selante, aplicada no animal e posteriormente observada *in vivo* demonstrando a sua presença pela fluorescência emitida. As

figuras 14 e 15 comprovam estas afirmações. Por este método foi possível também avaliar a biodistribuição do SFDPS do lobo direito, onde ocorreu a aplicação para o lobo esquerdo. Estes resultados permitem concluir que no tecido hepático o SFDPS foi capaz de se difundir para todo o resto do parênquima sem necessidade de aplicações em locais específicos. É sabido também que os tecidos muito vascularizados, tais como o fígado, são autofluorescentes. Isto é perfeitamente observável pela microscopia confocal, podendo um analista pouco experiente confundir o tecido com as proteínas previamente marcadas e concluir que há marcação onde na verdade ocorre apenas fluorescência natural do tecido.

Para contornar esta possível controvérsia foi realizada a quantificação para se distinguir a autofluorescência do tecido da fluorescência da serinoprotease sinalizada. Isto foi calculado e as diferenças observadas nos diferentes picos de intensidade de fluorescência claramente demonstrados na Figura 17. Esta experiência de marcação, pelo que se sabe até o presente momento, e pela avaliação da literatura mundial, foi realizada pela primeira vez neste trabalho. Este pioneirismo abre a possibilidade de novos estudos, em especial os de biodistribuição, onde poder-se-á avaliar o destino dos metabólitos do SFDPS após a sua polimerização, bem como a dispersão ou não das células tronco utilizadas em conjunto com este bioproduto.

O emprego de células tronco para a regeneração hepática é um dos mais recentes desafios da engenharia de tecidos. De acordo com Allers *et al.*, e Devine *et al.*, ao se injetar as CTMs pela veia porta ocorre migração incontrolável para áreas indesejáveis. Neste projeto foi demonstrado que mesmo injetando-se diretamente o SFDPS + CTMs no lobo direito do parênquima hepático houve difusão das mesmas para o outro lobo. Isto permite concluir que a difusão das CTMs no fígado não está relacionada com o sítio de aplicação. (71, 72). Por outro lado, a análise pela microscopia confocal mostrou que o SFDPS manteve as CTMs no local de aplicação durante pelo menos 15 dias após o tratamento. No grupo onde foi empregado apenas as CTMs sem o selante este fenômeno não foi observado. Assim, baseado nestas observações e na literatura é possível sugerir que as CTMs quando aplicadas diretamente no fígado difundem pelo sangue para outros tecidos como já havia constatado Allers *et al.*, e Devine *et al.* Outra observação importante foi a de que 30 dias

após a inoculação das CTMs sem o selante estas reapareceram no parênquima hepático. É possível que após a difusão para os demais tecidos, estas tenham voltado a se alojar no “órgão” doente, ou seja, no parênquima hepático cirrótico.

O grupo de estudo coordenado pelo professor Alexandre L R Oliveira do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, tem exaustivamente desde 2009, avaliado o emprego do SFDPS em cirurgias experimentais do sistema nervoso (73, 74, 75, 76). Este pesquisador foi um dos primeiros a observar que o SFDPS é capaz de aprisionar e manter as células tronco no sítio de aplicação.

Ferreira Junior (77, 50, 51) e colaboradores (33, 78, 79) em 2014 publicaram e patentearam (50, 51) o SFDPS como um novo arcabouço candidato *in vitro* para uso com células tronco. Estes pesquisadores também observaram o fenômeno do aprisionamento das células tronco no local de aplicação.

É possível especular que os pesquisadores empenhados no desenvolvimento e na aplicação médica do SFDPS já descobriram o “suporte”, ou seja, quem vai manter o “tecido” pendurado no local desejado. Falta agora descobrir que tipo de célula e que moléculas bioativas deverão ser aplicadas a fim de que a regeneração desejada ocorra. Este será o próximo grande desafio!

Por fim, em que pese o número de animais utilizados no experimento final deste trabalho esteja aquém do desejado, em decorrência de inúmeros problemas técnicos, foi possível observar que o SFDPS é também um arcabouço-candidato de ser utilizado no parênquima hepático. Esta característica peculiar deste biomaterial abre perspectivas de aplicações terapêuticas até então inimagináveis. Estudos futuros deverão ser realizados para comprovar definitivamente estas hipóteses.

6 – CONCLUSÕES

Os experimentos desenvolvidos nesta dissertação permitiram as seguintes conclusões:

-O método preconizado por Yu Wang *et al.*, (54) que utiliza o tetracloreto de carbono como droga indutora para o desenvolvimento da cirrose hepática experimental, não foi reproduzível a partir da literatura disponível;

-O método preconizado por Said *et al.*, (49) que utiliza a tioacetamida como droga indutora para o desenvolvimento da cirrose hepática experimental, foi reproduzido com sucesso, apesar de pequenas modificações;

-Os exames laboratoriais subsidiários e anatomopatológicos do fígado confirmaram o desenvolvimento de cirrose hepática nos *Rattus norvegicus* utilizados nos experimentos e submetidos ao protocolo de Said *et al.*;

-As CTMS de segunda passagem foram caracterizadas e confirmadas principalmente pelos marcadores positivos de superfície CD44, CD73, CD90, CD105 e CD54 conhecido também como ICAM;

-A serinoprotease utilizada na composição do SFDPS foi biomarcada pela primeira vez na literatura mundial com um rendimento de 68%. Esta marcação foi confirmada pela fluorescência emitida e observada *in vivo* por intermédio da microscopia eletrônica confocal;

-Com a serinoprotease marcada foi possível rastreá-la no parênquima hepático e observar a sua difusão para todo o parênquima a partir da inoculação no lobo direito;

-O uso combinado de SFDPS com CTMs e aplicado no fígado manteve as CTMs pelo menos trinta dias no sítio de inoculação;

-Ao que tudo indica, apesar do número de animais estudado estar aquém do desejado, o SFDPS é também um arcabouço importante para o transplante de células tronco no parênquima hepático;

-A técnica de biomarcação tanto do SFDPS, quanto das CTMs permitirão estudar detalhadamente a biodistribuição e as possíveis e futuras indicações terapêuticas destes componentes para cada situação específica.

7 - REFERÊNCIAS

- 1 - Andrade, ZA. Regression of hepatic fibrosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2005 Nov – Dec; 38 (6): 514 – 20.
- 2 - Fonseca, YO. Cirrose hepática e sua regressão: enfoque na capilarização sinusoidal, Fundação Osvaldo Cruz, **Dissertação de mestrado**, 2011.
- 3 – Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved Liver Function in Patients with Liver Cirrhosis After Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy. **Stem cells**. 2006;24:2292–2298.
- 4 - Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, Murray CJL, Naghavi M: Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Medicine**. 2014, 12:145.
- 5 - Muños-Torres E, Paz-Bouza JI, López-Bravo A, Abad-Hernández MM, Carrascal- Marino, E. Experimental thioacetamide-induced cirrhosis of the liver. **Histology e Histopathology**. 1991;6(1):95-100.
- 6 - David P, Alexandre E, Chenard-Neu M, Wolf P, Jaech D, Richert L. Failure of Liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase albuminaemic rats. **Laboratory Animals**. 2002; 36(2):158-164.
- 7 - Wang T, Shankar k, Ronis MJJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2000;294(2):473-479.
- 8 - Lima, TC. **Experimental**. Cirrose hepática induzida por Tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas Wistar [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2008.
- 9 - Chilakapati, J, Shankar, Korrapati, MC, Hill RA, Mehendale HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: Role in initiation of liver injury. **Drug metabolism and Disposition**. 2005;33(12):1877-1885.

- 10 - Ramaiah SK.; Apte, U.; Mehendale, HM. Cytochrome p4502e1 induction increases thioacetamide liver injury in diet-restricted rats. **Drug Metabolism and Disposition**. 2001;29(8):1088-1095
- 11 - Caro AA.; Cederbaum AI. Inhibition of CYP2E1 catalytic activity in vitro by S- adenosyl-L-methionine. **Biochemical Pharmacology**. 2005;69(7):1081-1093.
- 12 - Túnez I, Muñoz MC, Villa Viencio MA, Medina FJ, Prado EP, Espejo I, Barcos M, Salcedo M, Feijóo M, Montilla P. Hepato-and neurotoxicity induced by thioacetamide: protective effects of melatonin and dimethylsulfoxide. **Pharmacological Research**. 2005;52(3):223-228.
- 13 - Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. **Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure and Molecular Enzymology**. 1998;1384(1):66-78.
- 14 - Zaragoza A, Andrés D, Sarrión D, Cascales M. Potenciation of thioacetamide by phenobarbital pre treatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase system and age effect. **Chemico-Biological Interactions**. 2000;124(2):87-101.
- 15 – Ramaiah SK; Apte U; Mehendale HM. Cytochrome P4502E1 induction increases thioacetamide liver in diet-restricted rats. Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals. 2001;29(8):1088-1095.
- 16 - Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernández MI, Rios A, Medina FS, Gil A. Serum amino acid changes in rats with Thioacetamide-induced liver cirrhosis. **Toxicology**. 1996;106(1-3):197-206.
- 17 - Masumi S, Moriyama M, Kannan Y, Ohta M, Koshitani O, Sawamoto O, Sugano T. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused liver during the development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. **Toxicology**. 1999;135(1):21-31.
- 18 - Al Bader A, Mathew TC, Abul H, Al Sayer H, Singal PK, Dashti HM. Cholangiocarcinoma and liver cirrhosis in relation to changes due to thioacetamide. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2000; 208(1-2): 1-10.

- 19 - Jeong D, Jang J, Lee S, Lee J, Lim I, Lee M, Lee Y. Expression patterns of cells cycle- related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide. **Journal of Gastroenterology**. 2001;36(1):24-32.
- 20 - Moreira E, Fontana L, Torres MI, Fernández I, Ríos A, Medina FS, Gil A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 1995;19(6):461-469.
- 21 - Barros LC, Ferreira Jr RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini- Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A New Fibrin Sealant From Crotalus durissus terrificus Venom: Applications in Medicine, **Journal of Toxicology and Environmenatal Health**. Part B. 2010; June; 17.
- 22 – Sierra D. H. 1993. Fibrin sealant adhesive systems: A review of their chemistry, material properties ans clinical application. **Journal of Biomaterials Applicattions**. 7:309–352.
- 23 - Lerner R, Binur NS. Current status of surgical adhesives. **Journal Surgical Research**. 1990;48:165–181.
- 24 - Bergel, S.. Uber wirkungen des fibrins. **Journal Deutsche medizinische Wochenschrift**. 1909; 35: 633–665.
- 25 - Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. **Lancet**. 1940;2:126–128.
- 26 - Viterbo F, Thomazini IA, Giannini MJSM. Reparação de nervo periférico com cola de fibrina derivada de veneno de cobra. **Acta Cirurgica Brasileira**. 1993;8:85.
- 27 - Stolf HO. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from patients nasolabial fold. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. 1999;5:227.
- 28 - Barbosa MDS, Gregghi SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J Periodontol*. 2007;78(10):2026–31.

- 29 - Barbosa M D S, Stipp AC, Passanezi E, Greggi LA. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. Histological analysis. **Journal of Applied Oral Science**. 2008; 16: 310–315.
- 30 - Chiquito GCM. Comparison between suture and fibrin adhesive derived from snake venom for fixation of connective tissue graft in correction of marginal tissue recession. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007;13(2):559.
- 31 - Gatti MAN, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011;17(2):226-9.
- 32 - Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, Ferreira Junior RS, Carneiro MTR, Medolago NB, Barraviera B. A candidate snake venom-derived fibrin sealant to treat chronic venous ulcers. Aceito para apresentação como ePoster no 73rd Annual Meeting of the American Academy of Dermatology. TBA, San Francisco, California, USA, 2015.
- 33 - Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, Ferreira Jr. RS. A new fibrin sealant as 3D scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**. 5 78, 2014. doi:10.1186/scrt467.
- 34 - Matthew C. Good, Jesse G. Zalatan, Wendell A. Lim. Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. **Science**. 2011;332:680.
- 35 - Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. **Cloning Stem Cells**. 2004;6(4):369-74.
- 36 - Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Journal Tissue Engineering*. 2005;11(7-8):1198-1211.
- 37 - Schwindt TT, Barnabé GF, Mello L – Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, 2005; 16(1);13-19.
- 38 - Verfaillie C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biology**. 2002; 12(11):502-508.
- 39 - Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**. 2008; 15 (2): 109-16.

- 40 - Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2005; 7(5): 393-5.
- 41 - Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**. 1999; 284: 1168-1170.
- 42 - Kim JK, Park YN, Kim JS. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. **Cell Transplant**. 2010; 19: 1237–1246.
- 43 - Saito T, Okumoto K, Haga H. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. **Stem Cells and Development**. 2011;20:1503–1510.
- 44 – Salama H, Zekri ARN, Medhat E, Alim SAA, Ahmed OS, Bahnassy AA, Lotfy MM, Ahmed R, Musa S. Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease. **Stem Cell Research & Therapy**. 2014, 5:70, doi:10.1186/scrt459.
- 45 - Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2009;2:941.
- 46 - Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, et al. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J Biomed Biotechnol* 2011;:860578.
- 47 – Du Z, Wei C, Cheng K, Han B, Yan J, Zhang M, Peng C, Liu Y. Mesenchymal stem cell conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. **Journal of surgical research**. 2013;183:907-915.
- 48 - Han B, Lu Y, Meng B, et al. Cellular loss after allogenic hepatocyte transplantation. **Transplantation**. 2009; 87: 1–5.
- 49 - Said E; Said S A; Gameil NM, Ammar EM. Modulation of thioacetamide-induced liver fibrosis/cirrhosis by sildenafil treatment. **Canadian journal of physiology and pharmacology**. 2013;91:1055–1063.

50-Ferreira Júnior RS, Barraviera B, Barraviera SRCS, SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO MESMO E SEU USO. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140114360, data de depósito: 12/05/2014, título: "SELANTE DE FIBRINA PARA USO TÓPICO, MÉTODO DE FORMAÇÃO DO MESMO E SEU USO" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): FAPESP; CNPq; CAPES; UNESP.

51-Ferreira Junior RS, Barraviera B, ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO. 2014, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140114327, data de depósito: 12/05/2014, título: "ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA CÉLULAS TRONCO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DO MESMO E SEU USO" , Instituição de registro:INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Instituição(ões) financiadora(s): CAPES; CNPq; FAPESP; UNESP.

52 - Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-Giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. **Journal Venom Anim Toxins**. 2001;7(2):159-71.

53 - Brinson RB, Holts BE: Diarrhea associated with severe hypo-albumenemia: a comparison of a peptide based chemically defined diet and standard enteral alimentation. **Crit Care Med** 1988;16 :160-6

54 – Wang Y, Lian F, Li J, Fan W, Xu H, Yang X, Liang L, Chen W, Yang J. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats. **Journal of Translational Medicine**. 2012, 10:133

55 - Li CH, Yang RB, Pang JHS. Procalcitonin as a biomarker for bacterial infections in patients with liver cirrhosis in the emergency department. **Academic Emergency Medicine**. 2011;18:122-6.

56 – Traber PG, Chou H, Zomer E, Hong F, Klyosov A, Fiel Maria-Isabel,. Friedman SL. Regression of Fibrosis and Reversal of Cirrhosis in Rats by Galectin Inhibitors in Thioacetamide-Induced Liver Liver Diase. **PLOS ONE**. 2013 outubro; 8: 10.

- 57 - Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. **World Journal Gastroenterology**. 2005; 11:7461-7465
- 58 - Finco DR. Kidney function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5rd ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- 59 - Penteado, JF, Rocha AFG. **Conceitos gerais da Gastroenterologia**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1977.
- 60 - Martins MJ. As proteínas na prática médica: Dosagens. 2012.
- 61 - Póvoa P, Almeida E, Moreira P, Fernandes A, Mealha R, Aragão A, et al. C-reactive protein as an indicator of sepsis. **Intensive Care Medicine**. 1998;24(10):1052-6.
- 62 - Lobo SM. Sequential C-reactive protein measurements in patients with serious infections: does it help? **Crit Care**. 2012;16(3):130.
- 63 - Figueiredo FA, Dickson ER, Tousif P, et al. Impact of nutritional status on outcome after liver transplantation. **Transplantation**. 2000;70:1347-52.
- 64 - Siriboonkoom W, Gramlich L. Nutrition and chronic liver disease. **Canadian Journal Gastroenterology**. 1998; 12:201-7.
- 65 - Roongpisunthinpong C, Sobhonslidsuk A, Nantiruj K, Songchitsomboon S. Nutritional assessment in various stages of liver cirrhosis. **Nutrition**. 2001;17:761-5.
- 66 - Bouchier, IAD. Diagnosis of Jaundice. **Journal British Medical**. 1981 novembro; 283(14):1282.
- 67 – Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Biological characteristics of mesenchymal stem cells*. **Revista Brasileira Hematologia. Hemoterapia**. 2009;31(Supl. 1):25-35.
- 68 - Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, et al. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. **Molecular Therapy**. 2000;2:545- 551.

- 69- Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, Wada K, Oikawa K, Takikawa Y, et al. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. **Gut**. 2004;53:1001-1009.
- 70 - Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. **Stem Cells**. 2004;2:377-384.
- 71 - Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. **Transplantation**. 2004;78(4):503-8.
- 72 - Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. **Blood**. 2003;101(8):2999-3001
- 73 - BARBIZAN R, CASTRO M, RODRIGUES AC, BARRAVIERA B, FERREIRA JUNIOR RS (egresso do programa), Oliveira ALR. Motor Recovery and Synaptic Preservation after Ventral Root Avulsion and Repair with a Fibrin Sealant Derived from Snake Venom. Plos One, v. 8, p. e63260, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0063260
- 74 - BENITZ SU, BARBIZANI R, SPEJO AB, FERREIRA JUNIOR RS, Barraviera B, GOES AM, Oliveira ALR. Synaptic plasticity and sensory-motor improvement following fibrin sealant dorsal root reimplantation and mononuclear cell therapy. Frontiers in Neuroanatomy, 2014;8:96, doi: 10.3389/fnana.2014.00096.
- 75 - BARBIZAN R, VIDIGAL M, FERREIRA JUNIOR RS, Barraviera B, Oliveira ALR. Long-Term Spinal Ventral Root Reimplantation, but not Bone Marrow Mononuclear Cell Treatment, Positively Influences Ultrastructural Synapse Recovery and Motor Axonal Regrowth. International Journal of Molecular Sciences (Online), v. 15, p. 19535-19551, 2014. doi: 10.3390/ijms151119535
- 76 - Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira Junior RS, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, Góes AM, Oliveira ALR. Mesenchymal stem cells engrafted in a

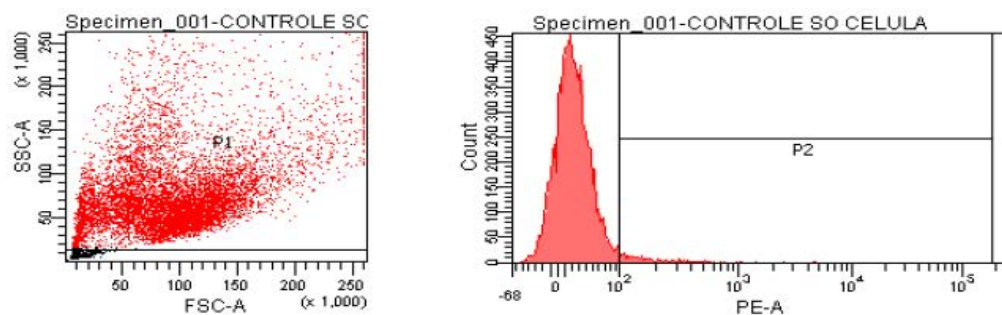
fibrin scaffold stimulates Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. Brain Research Bulletin. **(2015, in press)**

77 - Ferreira junior RS. Autologous or heterologous fibrin sealant scaffold: which is the better choice? **Journal of Venomous Animals Toxins incl Tropical Disease**, 2014.

78 – Neto Capuano F. Estudo comparativo da reparação de membrana sinusoidais e da formação óssea no interior do seio maxilar em coelhos após enxertos ósseos (Sinus Lift) com selante de fibrina e membrana de colágeno [dissertação]. São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2014.

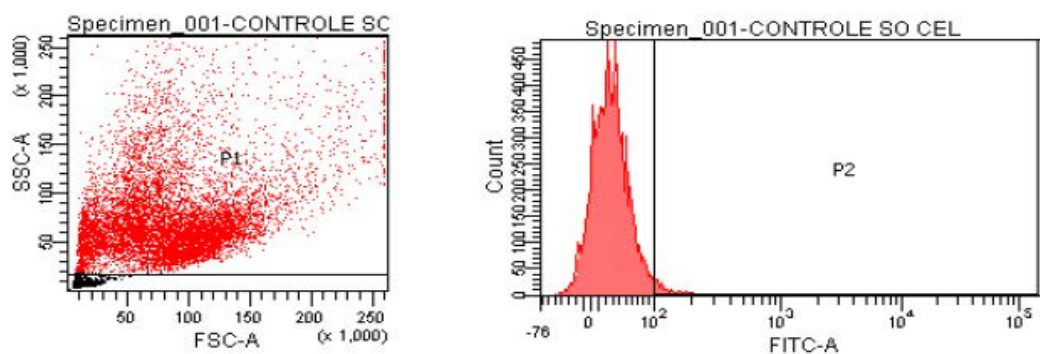
78 – Peres VS. EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DE PEÇONHA DE SERPENTE ASSOCIADO A CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CIRURGICA EM RATOS. [dissertação]. São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2014.

8 – APÊNDICE



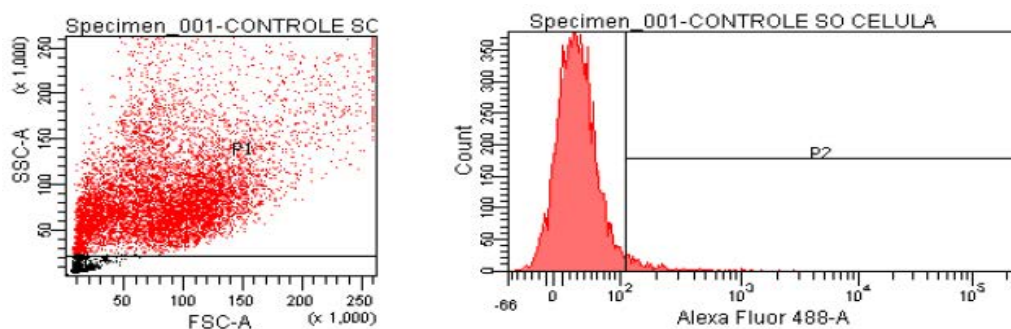
Experiment Name: MS RAT 3P PE				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CONTROLE SO CELULA				
Record Date: Nov 12, 2014 11:57:32 AM				
Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PE-A Median
All Events	10,000	####	23	16
P1	8,983	89.8	25	19
P2	238	2.6	231	148

Anexo 1 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem, controle células PE.



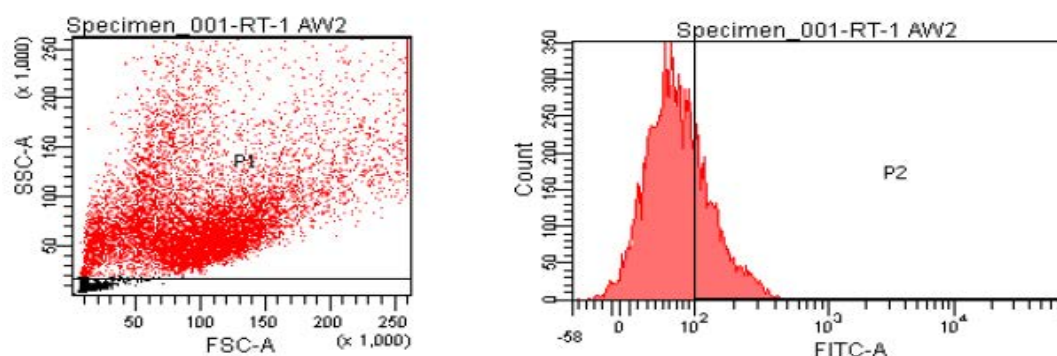
Experiment Name: MS RAT 3P FITC				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CONTROLE SO CEL				
Record Date: Nov 12, 2014 11:44:49 AM				
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	FITC-A Median
P1	8,521	85.2	30	25
P2	211	2.5	190	126

Anexo 2 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem, controle células FITC.



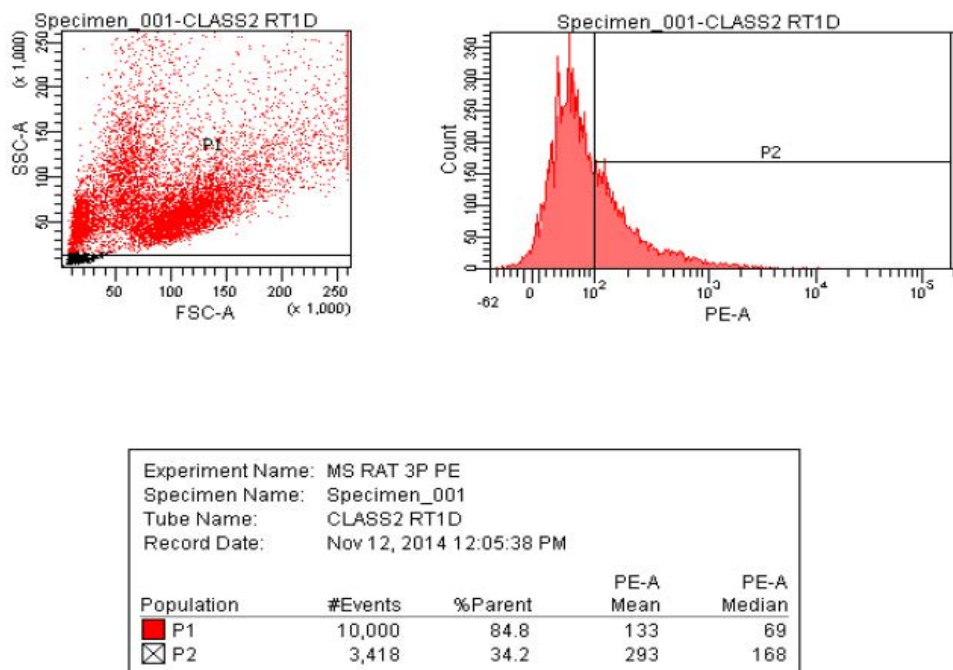
Experiment Name: MS RAT ALEXA 488				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CONTROLE SO CELULA				
Record Date: Nov 12, 2014 2:54:14 PM				
Population	#Events	%Parent	Alexa Fluor ... Mean	Alexa Fluor ... Median
P1	8,675	86.8	36	28
P2	264	3.0	252	165

Anexo 3 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem, controle células alexa flúor.

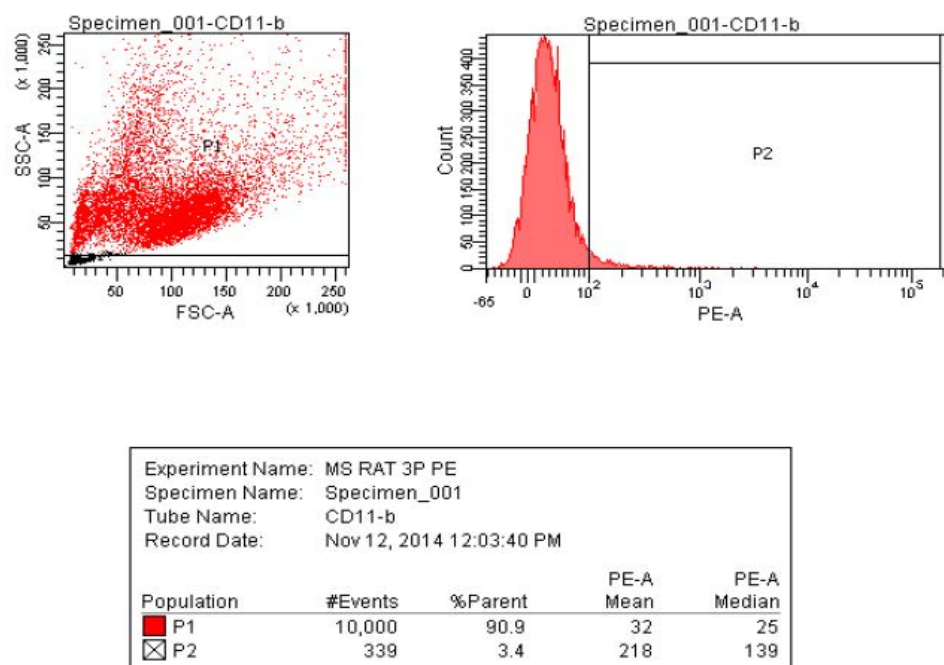


Experiment Name: MS RAT 3P FITC				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: RT-1 AW2				
Record Date: Nov 12, 2014 11:55:24 AM				
Population	#Events	%Parent	FITC-A Mean	FITC-A Median
P1	10,000	85.5	85	67
P2	2,712	27.1	173	137

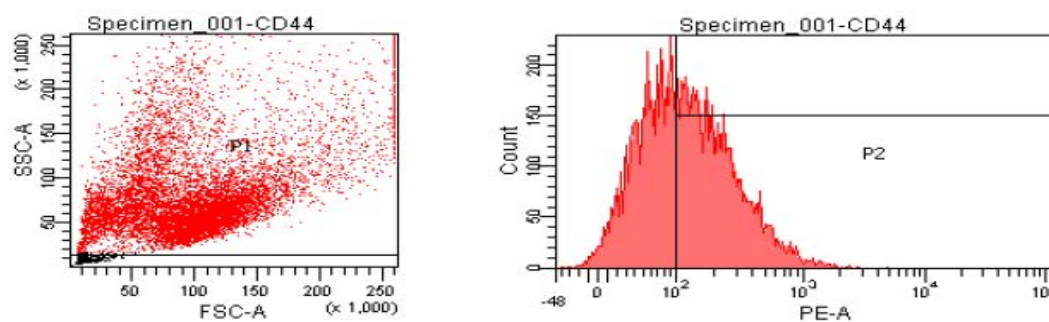
Anexo 4 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando baixa marcação para o marcador RT1 AW2 FITC.



Anexo 5 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando baixa marcação para o marcador CLASS RT1 PE.

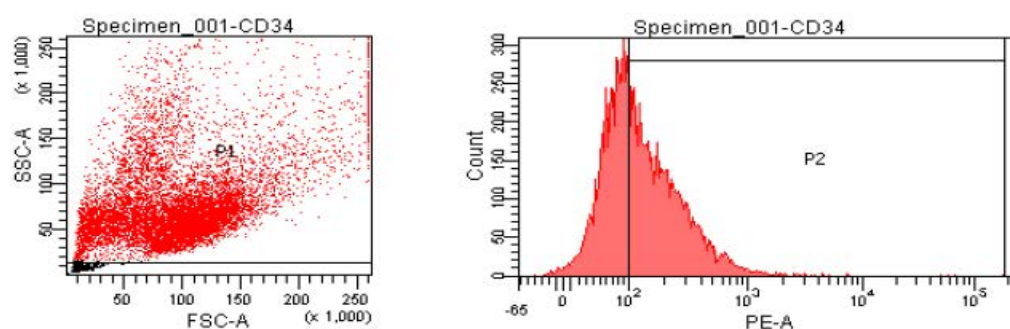


Anexo 6 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando baixa marcação para o marcador CD11-b.



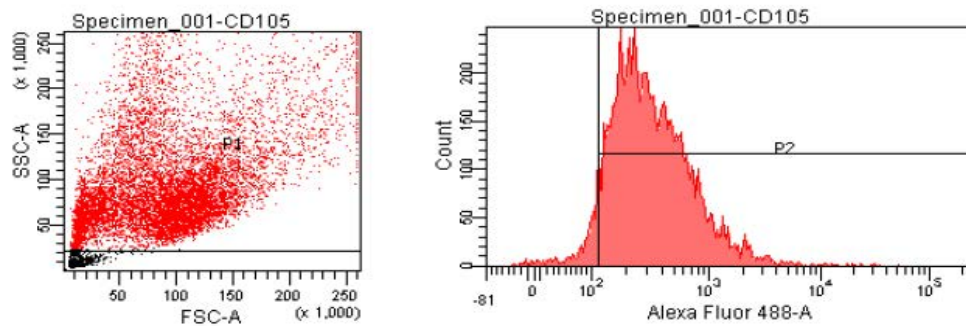
Experiment Name: MS RAT 3P PE				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CD44				
Record Date: Nov 12, 2014 12:02:28 PM				
Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PE-A Median
P1	10,000	89.8	166	112
P2	5,502	55.0	257	190

Anexo 7 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando média marcação para o marcador CD44.



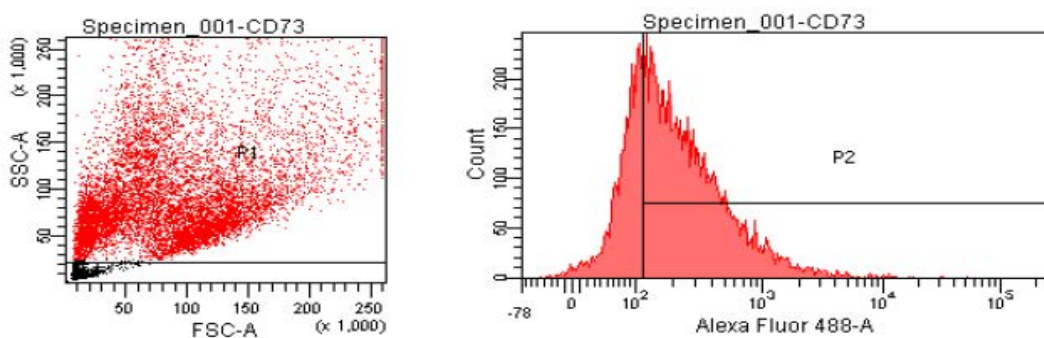
Experiment Name: MS RAT 3P PE				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CD34				
Record Date: Nov 12, 2014 12:01:21 PM				
Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PE-A Median
P1	10,000	89.7	203	111
P2	5,595	56.0	312	181

Anexo 8 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando média marcação para o marcador CD34.



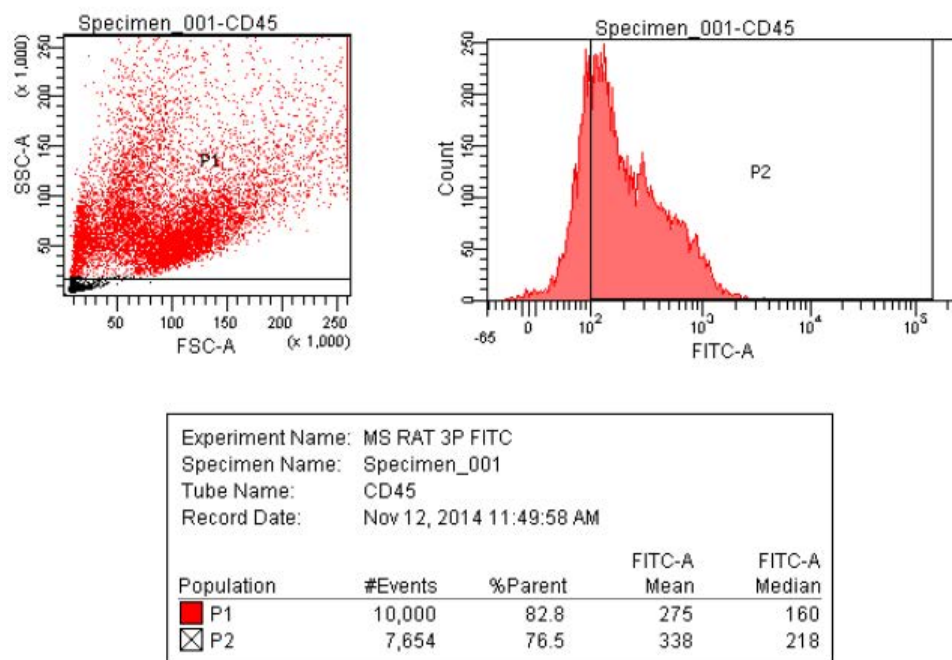
Experiment Name: MS RAT ALEXA 488				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CD105				
Record Date: Nov 12, 2014 2:57:59 PM				
Population	#Events	%Parent	Alexa Fluor ... Mean	Alexa Fluor ... Median
■ P1	10,000	88.8	489	284
☒ P2	9,390	93.9	515	300

Anexo 9 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando alta marcação para o marcador CD105.

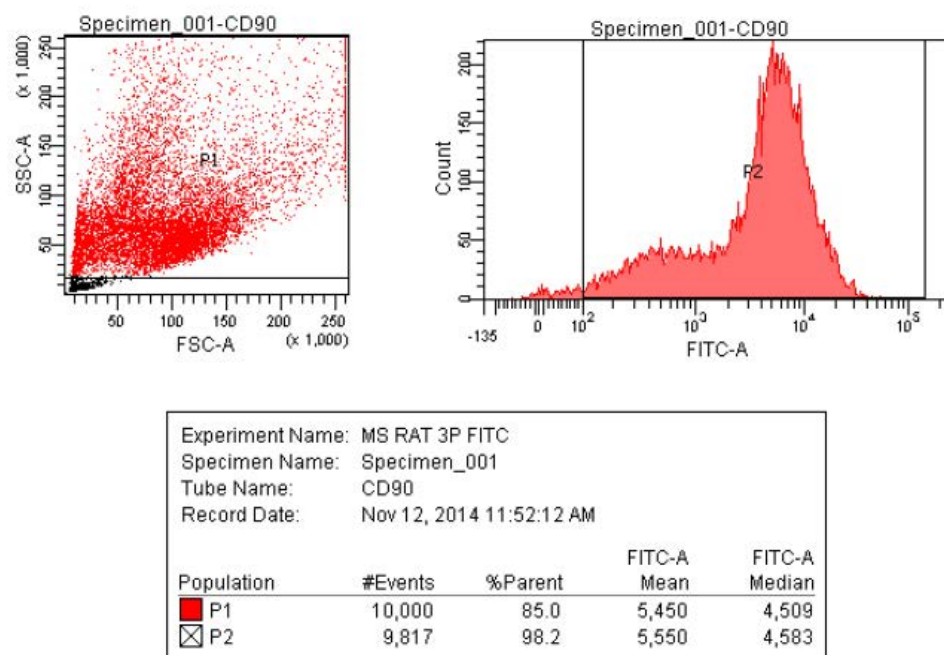


Experiment Name: MS RAT ALEXA 488				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: CD73				
Record Date: Nov 12, 2014 2:56:32 PM				
Population	#Events	%Parent	Alexa Fluor ... Mean	Alexa Fluor ... Median
■ P1	10,000	86.1	337	173
☒ P2	7,129	71.3	441	242

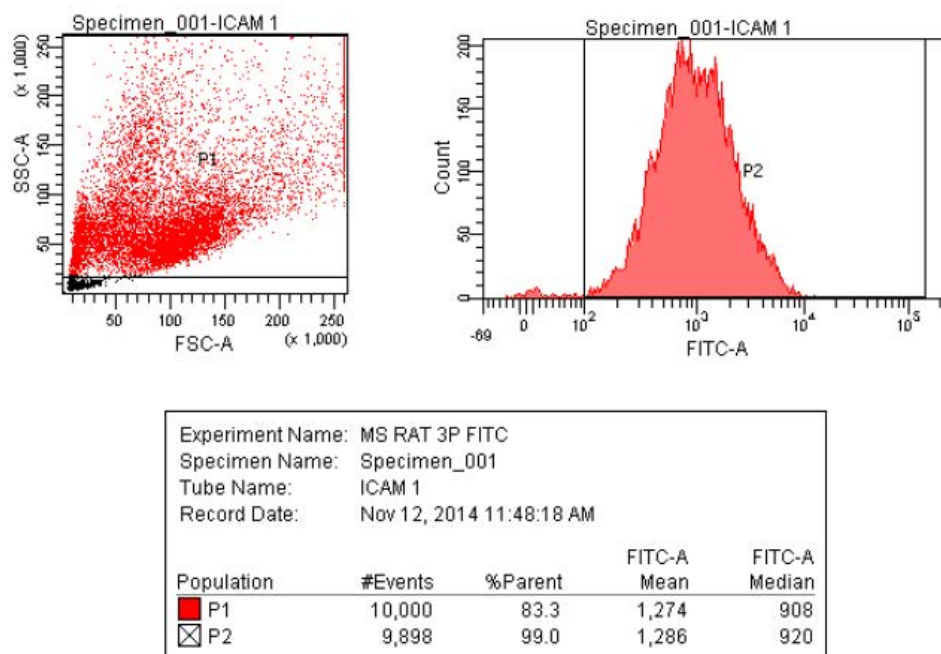
Anexo 10 – Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando alta marcação para o marcador CD73.



Anexo 11 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando alta marcação para o marcador CD45.



Anexo 12 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando alta marcação para o marcador CD90.



Anexo 13 - Análise por citometria de fluxo das células de cultivo de segunda passagem revelando alta marcação para o marcador ICAM 1.