

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MARCELA GUIMARÃES TAKAHASHI DE LAZARI

**INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO HEPÁTICA UTILIZANDO UMA PLATAFORMA
POLIMÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte - MG
Dezembro de 2017

MARCELA GUIMARÃES TAKAHASHI DE LAZARI

**INDUÇÃO DE PROLIFERAÇÃO HEPÁTICA UTILIZANDO UMA PLATAFORMA
POLIMÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Patologia Investigativa

Orientadora: Profa. Dra. Paula Peixoto Campos Lopes

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Xavier Pereira

Belo Horizonte – MG

2017

L431i Lazari, Marcela Guimarães Takahashi de.
Indução de proliferação hepática utilizando uma plataforma polimérica em camundongos [manuscrito] . / Marcela Guimarães Takahashi de Lazari.
-- Belo Horizonte: 2017.
88f.: il.
Orientador: Paula Peixoto Campos Lopes.
Coorientador: Luciana Xavier Pereira.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Regeneração Hepática. 2. Fígado/cirurgia. 3. Tecido Parenquimatoso. 4. Proliferação Celular. 5. Modelos Animais. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Lopes, Paula Peixoto Campos. II. Pereira, Luciana Xavier. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WI 702

Bibliotecária Responsável: Cibele de Lourdes Buldrini Filogônio Silva CRB-6/999

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), com a colaboração do Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica, também pertencente ao ICB/UFMG. Recebeu colaboração financeira da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha fortaleza, por conduzir os meus passos e por me aproximar de pessoas abençoadas e especiais durante a realização deste sonho.

Ao meu marido Saulo, por ter acompanhado essa trajetória e por ter me incentivado. Muitos foram os desafios, mas valeu a pena. Esta conquista é nossa.

Ao meu amado filho Gustavo, por estar sempre ao meu lado, participando ativamente de tudo o que faço. Juntos rimos, choramos, estudamos, fizemos orações, dormimos abraçados, escrevemos, tomamos leite quente, treinamos apresentações orais... Obrigada por fazer transbordar o meu coração de alegria com seu sorriso tão puro, demonstrando tanto amor por mim.

Aos queridos familiares, por toda demonstração de amor e incentivo, compreendendo a minha ausência em diversos momentos. Em especial, agradeço à minha mãe Cibele, por sempre torcer e orar por mim, por reconhecer os meus esforços e me ajudar quando preciso. Ao meu irmão Carlos Eduardo, que quando criança despertou em mim o desejo de fazer pesquisas experimentais (por brincadeiras) e por me apoiar nesta caminhada. Ao meu irmão João, minha cunhada Larissa e meus sobrinhos Estevão e Júlia pelo carinho e torcida aí na terra do sol nascente. Ao meu pai, Carlos e também à Kátia e ao meu irmão César, pelas orações, carinho e incentivo. Amo muito todos vocês.

Ao meu sogro Atacílio e sogra Eliana, por estarem sempre por perto e sempre dispostos a me ajudar, a cuidar da minha família e de mim. Obrigada por me auxiliarem nos cuidados com o Gustavo quando não pude acompanhá-lo. À minha cunhada Samantha e concunhado Renato, pelo suporte, carinho e torcida. Tudo isso foi indispensável para que eu chegasse até aqui. Vocês são especiais.

À minha amiga Susana Rates, por estar sempre por perto, contribuindo para que eu galgue lugares mais altos, em todos os aspectos da vida. Sou grata pela sua amizade sincera, por sua alegria e sorrisos que enchem o meu coração de ânimo e esperança.

Ao professor Anilton César Vasconcelos, por ter acreditado em mim e por ter aberto as portas do laboratório sem me conhecer. Obrigada pelo carinho e pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade.

À querida professora Paula Peixoto Campos Lopes, por ter me aceitado como voluntária de pesquisa no Laboratório de Apoptose, em seguida como aluna de

mestrado. Sou muito grata pelo seu carinho, ensinamentos, incentivo e suporte indispensáveis para vencer esta etapa.

À professora Luciana Xavier Pereira, minha Coorientadora, amiga especial, por ter me acompanhado e dedicado o seu tempo para me auxiliar quando precisei, compartilhando seu conhecimento, experiência, com paciência e carinho. Obrigada pelos abraços que me acalmaram, pelas orações, pelas palavras sinceras e por sempre torcer por mim.

À professora Silvia Passos Andrade, por todo o carinho demonstrado e pelas indispensáveis colaborações neste trabalho. É uma honra poder participar do mesmo grupo de pesquisa e aprender com você.

Aos professores do Departamento de Patologia Geral, por todos os momentos de aprendizado durante as disciplinas, atividades e em eventos realizados. Em especial, aos professores Ricardo Gonçalves, Ênio Ferreira e Tatiane Paixão, pelo carinho, ensinamentos e colaborações. Vocês são importantes para mim.

Aos amigos e colegas de laboratório, Alejandra, Simone, Celso, Clara, Letícia, por todas as contribuições, por tudo que aprendi com vocês durante o mestrado, por todo apoio que recebi e, também, por todos os momentos agradáveis que compartilhamos. Vocês são incríveis.

À Juliana pelo carinho, por ser minha companheira fiel nas gargalhadas de desespero, sempre me animando em situações complicadas. Ao Fábio, pelo incentivo e por ser esse professor nato, maravilhoso, que tanto me inspira. Ao César, pela disponibilidade, doçura e amizade. Ao Pedro, pela acolhida, carinho, sinceridade e ótimas risadas. Aos queridos amigos Adriano e Elisa, pelo carinho, boas conversas e por terem me ajudado a interpretar lâminas histológicas surreais.

Aos membros da banca, professores Paula Peixoto Campos Lopes, André Gustavo de Oliveira, Cristiano Xavier Lima, Luciana Xavier Pereira e Alexander Birbrair por aceitarem o convite e pelas contribuições importantes e indispensáveis para a conclusão do meu mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço de coração a todos que direta ou indiretamente contribuíram para tornar possível a realização e defesa deste trabalho.

"Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o SENHOR, porque, assim como os céus são mais altos do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos, mais altos do que os vossos pensamentos".

(Isaías 55:8-9)

RESUMO

O fígado é indispensável para manter a homeostase do corpo por ser responsável pelos principais processos metabólicos do organismo. Além disso, é um órgão que desenvolveu como característica importante a capacidade de regenerar-se. Apesar de muitos estudos sobre a regeneração do fígado, as doenças a ele relacionadas ainda são causas de óbito pela resposta insuficiente do órgão à regeneração, dependendo do grau de lesão. Portanto, sistemas bioartificiais tem sido propostos como substitutos na insuficiência hepática em estágio final. Aqui, relatamos uma plataforma biológica polimérica que induziu a proliferação sequencial do parênquima hepático dentro da plataforma em camundongos. Os discos porosos de poliéter-poliuretano foram colocados cirurgicamente no fígado e removidos nos dias 4, 8, 12 e 25 após a implantação. Não foram adicionados fatores de crescimento exógenos ou componentes da matriz extracelular na plataforma. Este dispositivo bio-híbrido proporcionou um preenchimento gradual com parênquima hepático e células não parenquimatosas, como detectado por análise histológica. Nos dias 12 e 25, uma estrutura semelhante ao fígado preenchia 2/3 da plataforma, sua organização se assemelhava ao do fígado controle, inclusive componentes vasculares, hepatócitos e outras células foram positivas para o marcador de proliferação celular por imunohistoquímica. Por coloração com Picrosirius, demonstrou-se que a deposição de colágeno no parênquima hepático no implante era semelhante ao fígado controle. A atividade de MPO foi maior no primeiro tempo avaliado (8 dias pós-implantação) e a atividade de NAG foi maior no dia 25 pós-implantação. Os níveis de TNF- α foram elevados nos dias 8 e 12, e no dia 25 retornou ao mesmo nível inicial, os níveis de VEGF atingiram o pico no dia 8 e os níveis de TGF- β 1 foram semelhantes em todos os tempos avaliados. A concentração sérica de proteínas totais, albumina e AST não apresentou alterações durante o período experimental, apenas ALT aumentou inicialmente após a implantação, mas retornou gradualmente aos níveis de controle. A plataforma porosa sintética (sem adição de fatores exógenos) colocada adjacente ao fígado dos animais exibe potencial de ser explorado para investigar mecanismos fisiológicos de regeneração hepática.

Palavras-chave: Modelo animal; Parênquima hepático; Proliferação celular; Implante.

ABSTRACT

The liver is indispensable for maintaining body homeostasis by acting in the metabolic processes. It is an organ that has developed an important characteristic of regenerating itself. Despite of many studies about on liver regeneration, liver diseases are still causes of death by subsequent failure depending on the lesion degree. Therefore, bioartificial liver systems have been proposed as surrogates for end-stage liver failure. Here, we report a polymeric biological platform that induced sequential proliferation of liver parenchyma inside the scaffold in mice. Porous discs of polyether-polyurethane were surgically placed on the liver and removed at days 4, 8, 12 and 25 after implantation. No exogenous growth factors or extracellular matrix components were added to the scaffold. This biohybrid device provided a scaffold that was gradually filled with parenchymal and non-parenchymal liver tissue as detected by histological analysis. By days 12 and 25 a liver-like structure filled 2/3 of the scaffold, its organization resembled that of a mature liver, inclusive vascular components. Therefore, hepatocytes and other cells were stained to immunohistochemistry for cell proliferation marker. By Picrosirius staining it was shown that collagen deposition in hepatic tissue into implant was similar to the control liver. MPO activity was higher in the first time evaluated (8 days post-implantation) and NAG activity was higher at day 25 post-implantation. TNF- α levels were elevated on days 8 and 12, returning to baseline at 25 days, VEGF levels peaked at day 8 and TGF- β 1 levels were similar at all-time points evaluated. The serum concentration of total proteins, albumin and AST did not change during the experimental period, only ALT increased initially after implantation, but gradually returned to control levels. The synthetic porous scaffold (without addition of exogenous factors) placed adjacent to the native animal liver exhibits the potential to be exploited to investigate physiological mechanisms of liver regeneration.

Keywords: Animal model, Liver parenchyma, Cell proliferation, Scaffold.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Localização do fígado humano.....	15
Figura 2: Macroscopia do fígado humano..	16
Figura 3: Localização do fígado em camundongo	18
Figura 4: Macroscopia do fígado de camundongo.....	19
Figura 5: Esquema de sinalização molecular externa na regeneração hepática após hepatectomia parcial	23
Figura 6: Implantação de matriz sintética.....	35
Figura 7: Perfil da proliferação hepática na matriz sintética.....	37
Figura 8: Marcador de proliferação celular	38
Figura 9: Análise da área de colágeno intra-implante.....	39
Figura 10: Componentes vasculares do fígado recém formado.	40
Figura 11: Níveis de MPO e NAG intra-implante.....	41
Figura 12: Níveis de TNF- α e VEGF e TGF- β 1 intra-implante.....	42
Figura 13: Avaliação da função hepática.....	43
Quadro 1: Funções hepáticas.	17
Quadro 2: Comparação entre o fígado humano e de camundongo.....	20
Quadro 3: Causas de falência hepática fulminante	26

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono, do inglês <i>carbon tetrachloride</i>
CDC47	Anticorpo marcador de proliferação celular
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Controle
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano, do inglês <i>damage-associated molecular pattern molecules</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DHA	Doença hepática alcoólica
DHGNA	Doença hepática não alcoólica
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócito, do inglês <i>hepatocyte growth factor receptor</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IHC	Imunohistoquímica, do inglês <i>immunohistochemistry</i>
MPO	Mieloperoxidase
NAG	<i>N-acetyl-β-D-glucosaminidase</i>
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NFκB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated b cells</i>

PBS	Tampão fosfato salina, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
SEM	Erro padrão da média, do inglês <i>standart error of the mean</i>
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa, do inglês <i>transforming growth factor alpha</i>
TGF- β 1	Fator de crescimento de transformação beta 1, do inglês <i>transforming growth factor beta 1</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor -Alpha</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	Fator de crescimento endotelial, do inglês <i>Vascular endothelial growth Factor</i>
STAT 3	proteína pertencente à família das STATs, do inglês <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Fígado	15
1.1.1 Características morfológicas.....	15
1.1.2 Funções hepáticas.....	17
1.1.3 Comparação entre os fígados humano e de camundongo.....	18
1.2 Regeneração hepática	21
1.3 Lesões hepáticas.....	24
1.3.1 Epidemiologia	24
1.3.2 Lesões hepáticas não passíveis de regeneração.....	25
1.4 Biomateriais.....	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Aspectos éticos	30
4.2 Animais.....	30
4.3 Modelo experimental	31
4.4 Análises histológicas e imunohistoquímicas	32
4.5 Determinação das atividades de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) intra-implante.....	33
4.6 Dosagem do conteúdo de TNF- α , VEGF e TGF- β 1 intra-implante.....	34
4.7 Função hepática	34
4.8 Análises estatísticas	35

5 RESULTADOS	35
5.1 Macroscopia e microscopia dos implantes.....	35
5.2 Proliferação hepática intra-implante	36
5.3 Análise do colágeno intra-implante	39
5.4 Análise de componentes vasculares do fígado recém-formado.	39
5.5 Dosagem dos níveis de NAG e MPO intra-implante	41
5.6 Dosagem do conteúdo de TNF- α , VEGF e TGF- β 1 intra-implante	41
5.7 Avaliação da função hepática	42
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	48
8 REFERÊNCIAS	50
9 ANEXOS.....	57
9.1 ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	57
9.2 ANEXO B - Artigo publicado na Revista Life Sciences	58
9.3 ANEXO C - Ata da defesa da dissertação de mestrado.....	87
9.4 ANEXO D - Folha de aprovação.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fígado

1.1.1 Características morfológicas

O fígado é a maior víscera do corpo humano, localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Apresenta-se macroscopicamente subdividido em quatro lobos (direito, esquerdo, quadrado e caudado), com ligamentos proeminentes em sua superfície, conforme Figuras 1 e 2 (BRASILEIRO, 2012; GARTNER; HIATT, 2007; NETTER, 2011).

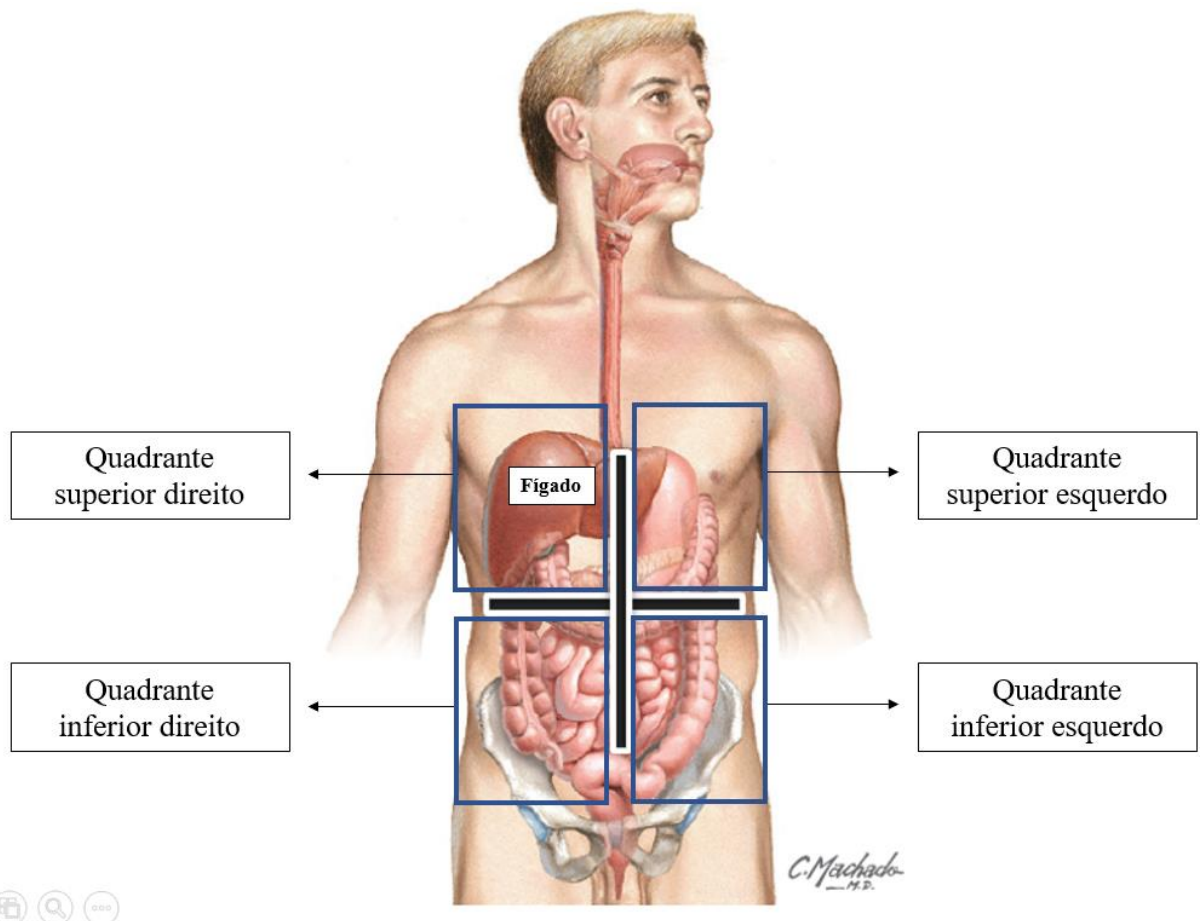


Figura 1 – Localização do fígado humano. A maior víscera do corpo humano, o fígado, está localizado no quadrante superior direito ou hipocôndrio direito do abdômen, abaixo do diafragma. Fonte: Adaptado de Rogers; Dintzis (2012, p. 195).

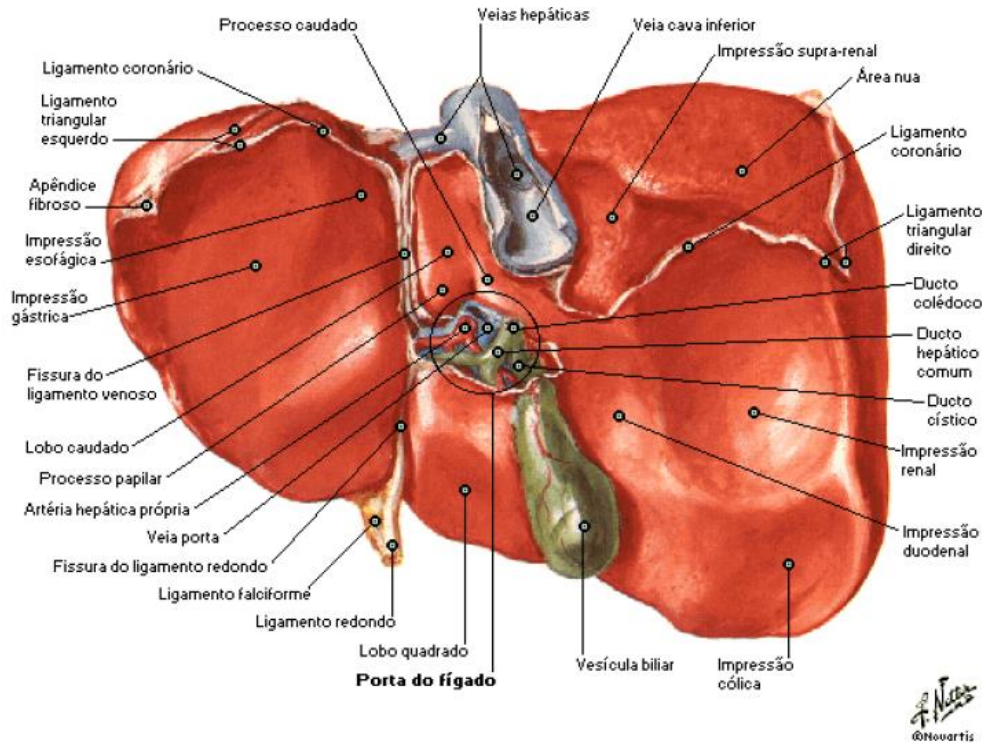
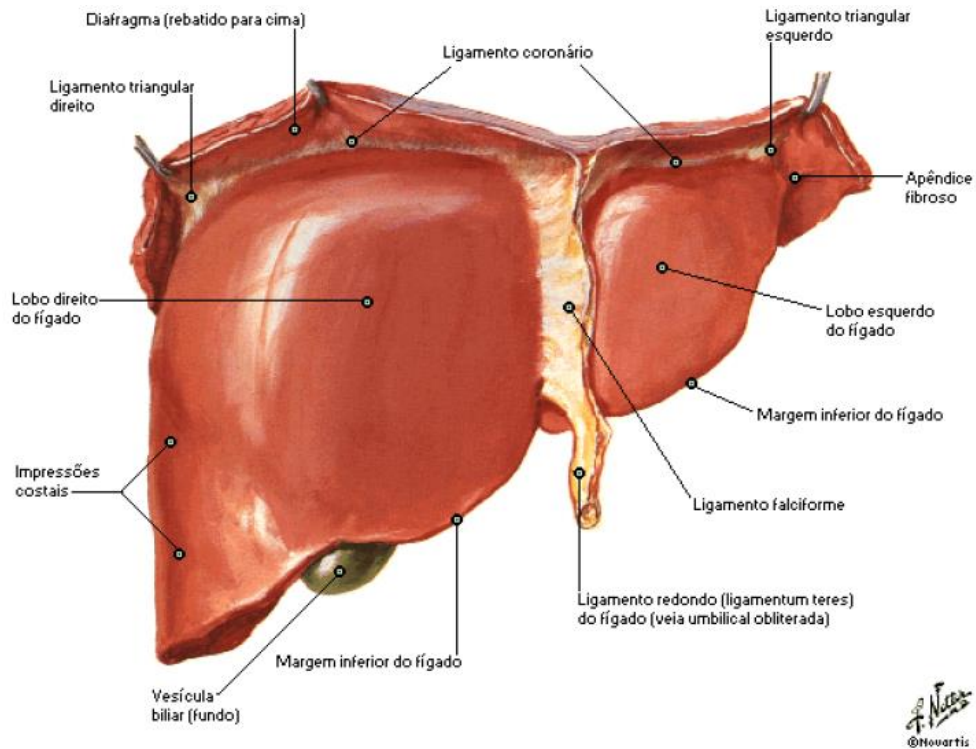


Figura 2 – Macroscopia do fígado humano. O fígado é subdividido em quatro lobos: direito, esquerdo, quadrado e caudado, com ligamentos proeminentes em sua superfície, conforme ilustrado e identificado na figura. Fonte: Atlas de Anatomia Humana (NETTER, 2011).

É um órgão ricamente vascularizado, com dupla irrigação sanguínea, recebendo sangue oxigenado da artéria hepática esquerda e da artéria hepática direita, bem como sangue rico em nutrientes advindo dos intestinos através da veia porta. Após a metabolização, secreção e detoxificação pelos hepatócitos, o sangue é drenado pelas veias hepáticas e direcionado à veia cava inferior (GARTNER; HIATT, 2007; GUYTON; HALL, 1996).

1.1.2 Funções hepáticas

O fígado é um órgão versátil, capaz de realizar funções indispensáveis para manter a homeostase corporal. Seguem abaixo algumas das principais funções por ele realizadas (Quadro 1).

Funções hepáticas	
Produção da bile	Auxilia no processo de digestão, emulsificando a gordura da dieta.
Armazenamento de vitaminas	A, D, B ₁₂ , entre outras.
Metabolismo de lipídios	Armazena triglicérides e realiza a quebra por estímulo hormonal.
Manutenção da glicose no sangue	Armazena glicose em glicogênio e realiza glicogenólise quando necessário.
Conversão de substância nocivas	Converte amônia em uréia.
Formação de fatores de coagulação	Forma fibrinogênio, fator III, globulina aceleradora e protrombina.
Função imunológica	Pela atuação das células de <i>Kupffer</i> e <i>natural Killers</i> .
Síntese de proteínas	Produz albumina, proteínas do sistema complemento, globulinas e todos os aminoácidos não-essenciais.
Degradação hormonal	Degrada hormônios de glândulas endócrinas.
Detoxificação de substâncias nocivas	Inativa drogas e toxinas.

Quadro 1 – Funções hepáticas.

Elaborado com base em: Brasileiro (2012); Gartner; Hiatt (2007); Wisse et al (1997).

Neste contexto, é necessário que a estrutura do fígado esteja preservada para a execução adequada de todas as suas funções, indispensáveis para a homeostase do organismo. Infortunadamente, o fígado, como qualquer outro órgão, é passível de sofrer lesões que, dependendo dos fatores influenciadores, podem levar à redução ou perda de função (CORLESS, 1983; FOX; BROWN, 2012; STRAUSS, 2011).

1.1.3 Comparação entre os fígados humano e de camundongo

Ao comparar o fígado humano com o de camundongo, que é o nosso modelo de estudo, são notáveis as semelhanças como o tamanho do órgão (maior víscera), divisões de lobos hepáticos (ambos com quatro lobos), localização abaixo do diafragma (Figura 3), bem como as formações lobulares intra-hepática e a presença dos mesmos tipos celulares (hepatócitos, células estreladas, células de *Kupffer*, entre outras) (GARTNER; HIATT, 2007; ROGERS; DINTZIS, 2012).

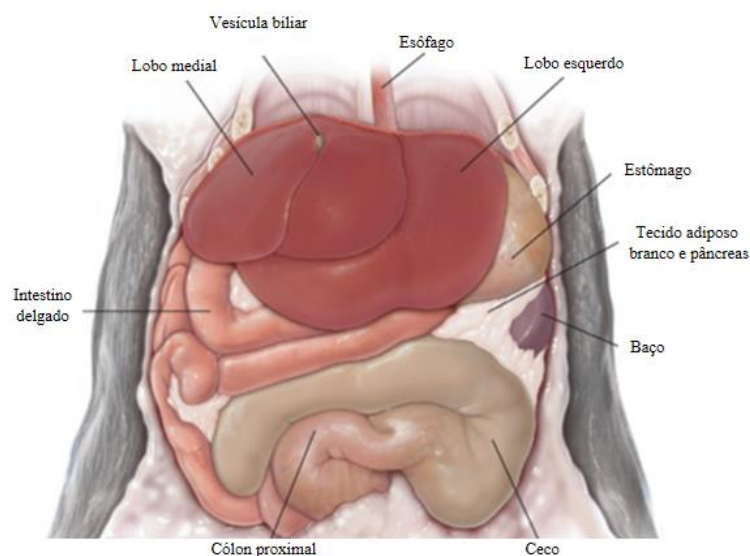


Figura 3 – Localização do fígado em camundongo. O fígado localiza-se na linha média ventral, centralizado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Fonte: Traduzido de Rogers; Dintzis (2012, p. 195).

Constituído por quatro lobos (medial, esquerdo, direito e caudado) (Figura 4), o fígado de camundongo exibe uma formação vascular na qual, em semelhança ao humano, o sangue venoso e arterial entra no lóbulo através de tríades portais (ROGERS; DINTZIS, 2012).

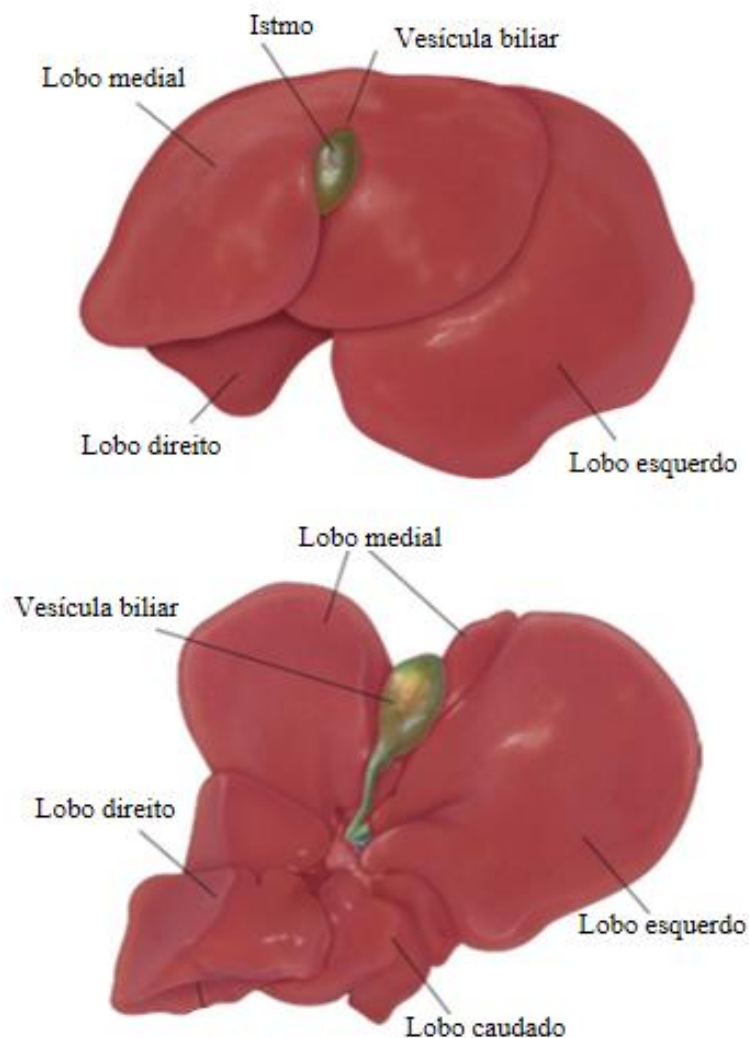


Figura 4 – Macroscopia do fígado de camundongo. Os quatro lobos exibidos pelo fígado de camundongo são: direito, esquerdo, quadrado e caudado. Fonte: Traduzido e adaptado de Rogers; Dintzis (2012, p. 196).

Sob a análise microscópica, tanto o fígado humano como o de camundongo apresentam uma organização hexagonal de lóbulos clássicos, na qual o humano exibe cordões de hepatócitos bem definidos e alinhados, enquanto no fígado de

camundongo esta organização não é tão linear. O volume da massa do órgão em relação ao corpo é maior no camundongo. Além disso, o fígado dos camundongos exibe menos tecido conjuntivo do que o de humanos, tanto na saúde como na doença (ROGERS; DINTZIS, 2012). O Quadro 2 detalha a comparação do fígado do camundongo com o fígado humano.

As diferenças existentes entre as duas espécies devem ser observadas e consideradas para a utilização de camundongos como modelos de pesquisa. Entretanto, todas as semelhanças encontradas na estrutura geral e funções hepáticas entre o humano e o camundongo superam as diferenças, reforçando a viabilidade da utilização do modelo animal em trabalhos experimentais, principalmente a semelhança na capacidade de regeneração, sendo uma característica importante para os estudos científicos (ROGERS; DINTZIS, 2012).

CARACTERÍSTICA	CAMUNDONGO	HUMANO
Localização	Subdiafragmático	Quadrante abdominal superior direito
Lobos	4: Medial, esquerdo (maior), direito (bisechado), caudado	4: Direito (maior), esquerdo, caudado, quadrado
Vesícula biliar	Istmo central do lobo medial	Abaixo do lobo direito
Ligamentos	Indistinto	Proeminente
Lóbulos hepáticos	Menos aparente	Aparente
Triades portais	Pequenas triades não aparentes	Todos os tamanhos são aparentes
Tecido conjuntivo fibroso dentro e entre triades	Não é proeminente em saúde ou doença	Não é proeminente em saúde; aparente em cirrose
Estrutura do sinusóide	Fenestrado e descontínuo	Fenestrado e descontínuo
Canalículos biliares	Não facilmente detectável no fígado normal	Não facilmente detectável no fígado normal
Hepatócitos bi e multinucleados	Comum com o avanço da idade	25% das células
Citoplasma - degeneração hidrópica e aumento de volume	Comum após refeição	Incomum
Células de Kupffer	Comum; melhor vistas com imunohistoquímica F4/80	15% do total de células do fígado
Células de Ito	Presentes em sinusóides	Presentes em sinusóides

Quadro 2 – Comparação entre o fígado humano e de camundongo. Fonte: adaptado de Roger; Dintzis (2012, p. 194).

1.2 Regeneração hepática

Estudos científicos sobre regeneração hepática tem demonstrado que este processo já é bem estabelecido em mamíferos, consistindo na restauração da massa hepática, restabelecendo as funções necessárias para a manutenção da homeostasia do corpo. Além disso, a relação peso do órgão/peso corporal pode alcançar até 100% da dimensão original após a hepatectomia parcial ou outras lesões (MICHALOPOULOS, 2014; MICHALOPOULOS; DEFRANCES, 1997). Isso ocorre por um mecanismo de crescimento compensatório, no qual as células remanescentes após a agressão ao fígado se proliferam para substituir as células perdidas (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006).

Entre as abordagens para o estudo da capacidade regenerativa do fígado, podemos citar o modelo de hepatectomia parcial em roedores, técnica primeiramente descrita por Higgins e Anderson, em 1931. A cirurgia, pode ser realizada através da hepatectomia parcial ou oclusão da veia porta, e induz a regeneração compensatória do lobo do fígado remanescente ou regeneração compensatória do lobo contralateral (HIGGINS; ANDERSON, 1931). Outro modelo de lesão é a administração de produtos químicos lesivos, como o tetracloreto de carbono (CCl_4) e o acetaminofeno (HARDIN, B. L., 1954; LI et al., 2015; MILLER et al., 1976). A administração de produtos químicos hepatotóxicos resulta na morte de hepatócitos e, em seguida, na regeneração e no reparo tecidual (WEI et al., 2015).

A utilização de modelos animais forneceu a base para a compreensão de mecanismos e sinais moleculares que controlam a regeneração do fígado gravemente lesado (Figura 5). Após hepatectomia parcial, os hepatócitos são as primeiras células a responderem aos estímulos regenerativos, desencadeados por receptores

importantes no processo de proliferação celular, e em seguida outras células do órgão também proliferam, como as células do ducto biliar, células estreladas e células endoteliais.

No início do processo regenerativo, também chamado de *fase de iniciação*, o fígado desenvolve uma resposta de fase aguda, quando células inflamatórias locais identificam os sinais liberados pela morte das células hepáticas, os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs - do inglês *damage-associated molecular pattern molecules*) e liberam citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (POSSAMAI et al., 2014).

Em seguida, na fase de proliferação, as citocinas (TNF- α e IL-6) e também fatores de crescimento, como fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) e fator de crescimento epidermal (EGF), induzem a entrada dos hepatócitos no ciclo celular. Tais sinais mitogênicos são provenientes da quebra da matriz e de hepatócitos e células adjacentes, como células endoteliais, células estreladas e macrófagos. Hepatócitos em proliferação, por sua vez, sintetizam fatores de crescimento efetivos para as células adjacentes, como TGF- α , FGF, VEGF, PDGF, entre outros.

Células epiteliais biliares também respondem aos sinais proliferativos dos hepatócitos (HGF, EGFR) e produzem PDGF, que atua como fator mitogênico para células estreladas (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006; MICHALOPOULOS, 2013). Em resposta aos estímulos das citocinas e fatores de crescimento, as células hepáticas desencadeiam uma resposta intracelular, acionando vias de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição, como por exemplo o NF κ B, que permitem transcrição de genes relacionados ao ciclo celular.

A ativação de NFκB nos hepatócitos, após hepatectomia parcial, é induzida por TNF-α e também por outros fatores, como EGF e HGF. Estes sinais também ativam o ciclo celular por desencadearem outro fator de transcrição, o STAT3 (FUJIYOSHI; OZAKI, 2011; MICHALOPOULOS, 2013, 2014). O fim do reparo ocorre quando o fígado reestabelece sua massa e função, correspondente a *fase de inibição* do processo regenerativo. Os principais sinais dessa fase são induzidos por TGF-β1. Além dele, a MEC parece também regular a resposta dos hepatócitos aos fatores de crescimento (MICHALOPOULOS, 2014; RIEHLE et al., 2011).

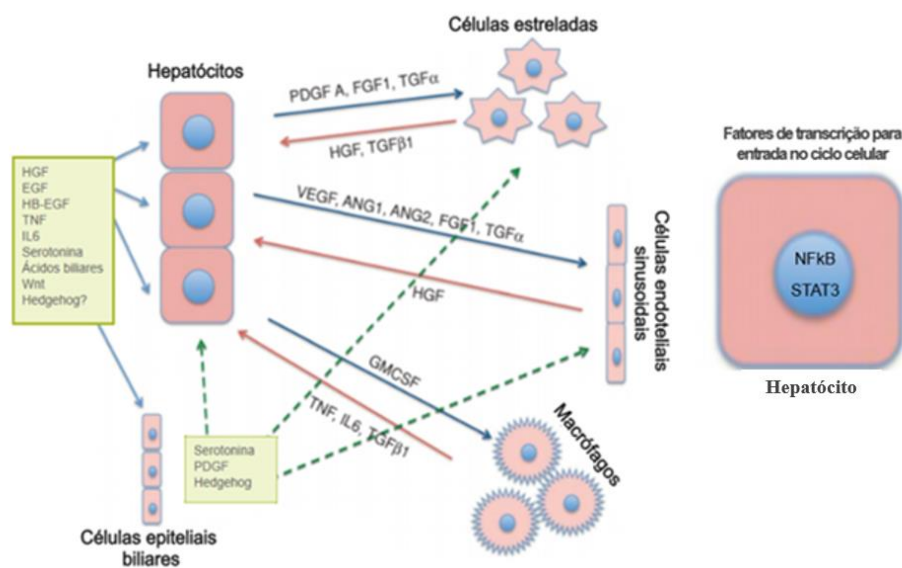


Figura 5 - Esquema de sinalização molecular externa na regeneração hepática após hepatectomia parcial. Fatores de crescimento mitogênicos e fatores auxiliares convergem em hepatócitos para induzir a entrada no ciclo celular. Isso desencadeia produção de crescimento sinais de hepatócitos, que são direcionados para outros tipos de células hepáticas, induzindo sua entrada em proliferação e estimulando a produção de sinais de crescimento, são direcionados de volta aos hepatócitos. Fonte: traduzido e adaptado de Michalopoulos (2013).

Portanto, é possível perceber o quanto todo esse processo é complexo, envolvendo as diferentes células presentes no fígado que respondem a diversos fatores mitogênicos e citocinas, induzindo o alcance da homeostase em resposta a

alguma lesão. Porém, dependendo da progressão do dano, a restauração do parênquima e estrutura hepática tornam-se insuficientes.

1.3 Lesões hepáticas

1.3.1 Epidemiologia

Diversos tipos de lesões no fígado podem ocorrer em decorrência de condições patológicas, sendo que as principais compreendem: (a) as de natureza inflamatória, como hepatites agudas ou crônicas e as esteato-hepatites; (b) as lesões da árvore biliar, como as malformações e as colangites; (c) as alterações vasculares, que atingem principalmente os ramos venosos portais, como ocorre na esquistossomose, ou o sistema de drenagem do órgão, como a doença veno-oclusiva ou trombose das veias hepáticas. A insuficiência cardíaca também é considerada uma importante causa de distúrbios no segmento pós-sinusoidal da circulação hepática (BRASILEIRO, 2012).

As hepatites causadas por vírus, são infecções definidas por inflamação do fígado, podendo resultar em doença que varia de leve a grave (WHO, 2017). Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que 130 a 150 milhões de pessoas em todo o mundo tem infecção crônica pela hepatite C e cerca de 500.000 morrem todos os anos por doenças hepáticas relacionadas à hepatite C (WHO, 2017).

A doença hepática alcoólica (DHA) é um tipo de dano ao fígado causado pelo uso abusivo de álcool e é a causa mais comum de cirrose no mundo ocidental e uma das dez causas comuns de morte (KAPLAN, 2004). Em 2015, uma estimativa revelou que cerca de 325 milhões de pessoas foram diagnosticadas com hepatite crônica e destas mais de 1 milhão de pessoas evoluíram ao óbito (WHO, 2015).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é definida como infiltrações gordurosas no fígado que não são causadas pelo álcool e ocorre em aproximadamente 20% da população em todo o mundo (SATTAR; FORREST; PREISS, 2014). A Organização Mundial de Gastroenterologia, através de diretrizes publicadas em 2012, demonstraram que a prevalência de DHGNA duplicou nos últimos 20 anos. Tanto a DHGNA como a esteato-hepatite não alcoólica (NASH) estão associadas ao diabetes e à obesidade e juntos são considerados a principal causa de doença hepática nos países do ocidente (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION GLOBAL GUIDELINES, 2012). Entre 10 e 30% dos pacientes com DHGNA tem NASH e progredem para a cirrose (DYSON; ANSTEE; MCPHERSON, 2015).

Mokdad *et al* (2014), apontam a cirrose como uma das complicações das doenças hepáticas, uma doença crônica caracterizada pela substituição de parênquima fisiológico por tecido cicatricial (fibrose). Mundialmente, foi estimado que em 2010 mais de um milhão de óbitos ocorreram pela cirrose, o equivalente a cerca de 2% de todas as mortes em todo o mundo (MOKDAD *et al.*, 2014). Neste contexto, diversas lesões hepáticas, quando não tratadas adequadamente, favorecem a sua evolução, estimulando o desenvolvimento de doença hepática grave e a incapacidade regenerativa (BLACHIER *et al.*, 2013; CIENFUEGOS *et al.*, 2014).

1.3.2 Lesões hepáticas não passíveis de regeneração

A regeneração ocorre na maioria das doenças hepáticas, porém, existem doenças que não desenvolvem este processo, as quais são classificadas como doenças hepáticas fulminantes (DHF). São várias as DHF e igualmente de diferentes etiologias tais como hepatites por vírus, uso de medicamentos, doenças metabólicas,

exposição a tóxicos, isquemia e uma miscelânea de doenças listadas no quadro 3. A investigação de todos os possíveis agentes etiológicos é criteriosa, entretanto, nem sempre é bem sucedida, e cerca de 40% a 50% dos casos ficam sem etiologia determinada (ACHARYA et al., 1996).

Exposição a drogas e toxinas	Infecciosas	Miscelâneas
a) Relacionada à dose Acetaminofeno CCl ₄ Amanita phalloides Fósforo amarelo	Hepatites virais: A, B e associações Citomegalovirus Herpes simples Epstein-Barr Paramixovirus Adenovirus	Hepatite auto-imune Doença de Still do adulto Linfoma Metástases hepáticas (melanomas, pulmão) Esteatose aguda na gravidez
b) Idiossincrásica Halotano Isoniazida Rifampicina Tetraciclina Dissulfiram Síndrome de Reye (ácido acetilsalicílico) Cetoconazol Antiinflamatórios não hormonais Antitireoidianos, hidantoínas, alfa-metildopa Isquêmicas/hipóxia Doença veno-oclusiva Disfunção primária hepática pós-transplante Choque hepático isquêmico Insuficiência cardíaca	Dengue Febre amarela Metabólicas Doença de Wilson Deficiência de alfa 1-antitripsina Galactosemia Tirosinemia	Hipertermia Hepatectomia parcial Criptogenética

Quadro 3 – Causas de falência hepática fulminante. Fonte: Adaptado da publicação sobre Falência hepática, da Sociedade Brasileira de Hepatologia (www.sbhepatologia.org.br/pdf/FASC_HEPATO_27_FINAL.pdf)

Baseado em tais doenças, pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar qual seria o "gatilho" inicial para desencadear a resposta regenerativa, esclarecer a cinética deste processo na proliferação hepática e o funcionamento deste tecido. No entanto, os modelos experimentais desenvolvidos até agora para o estudo da regeneração e/ou proliferação hepática requerem uma injúria prévia (lesão hepática, hepatectomia parcial) e, com isso, a busca por novos modelos para o estudo da regeneração e proliferação hepática tornou-se necessária. Nesse sentido, novas abordagens da medicina regenerativa baseada em biomateriais tem sido propostas para melhorar a regeneração hepática, desde que eles forneçam um microambiente

passível de ser controlado (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011; PEREZ; JUNG; KIM, 2017).

1.4 Biomateriais

Biomateriais são estruturas biocompatíveis que tem sido utilizadas como plataformas capazes de interagir com os sistemas biológicos, para utilização em novos procedimentos terapêuticos (LANGER; TIRRELL, 2004; PARK; LAKES, 2007; RATNER, 2016). São considerados uma das bases da engenharia de tecidos que, de forma interdisciplinar, relaciona princípios de biologia e engenharia, afim de desenvolver substitutos de tecido funcional (ABBOTT et al., 2016; LANGER; VACANTI, 1993). Os biomateriais proveem um suporte tridimensional para a integração entre as células e moléculas, guiando temporalmente e espacialmente o complexo processo multicelular da formação e regeneração tecidual (LANGER; TIRRELL, 2004; NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Recentes estudos buscam aplicar o desenvolvimento de novos materiais para medicina regenerativa do fígado, associando a estes biomateriais fatores de crescimento e/ou componentes extracelulares em plataformas poliméricas implantados diretamente no parênquima lesado. Hammond *et al* (2011), mostraram que a incorporação de fatores de crescimento e de derivados da MEC do fígado, em um biomaterial constituído de polímero biodegradável, promoveu a proliferação de células hepáticas e células não parenquimais na plataforma implantada junto ao fígado normal e lesado (HAMMOND et al., 2011a). Outros pesquisadores testaram uma plataforma constituída de material da família do poliéster polihidroxicanoato (PHA), produzido por uma bactéria recombinante *Aeromonas hydrophila*. A plataforma foi preenchida com células tronco do cordão umbilical humano e transplantada em

animais que apresentaram lesão hepática devido ao tratamento com CCL₄ e a partir do dia 14 o fígado mostrou sinais de regeneração (LI et al., 2015).

Outra estratégia utilizada de forma geral nos estudos de regeneração de tecidos tem sido a descelularização de órgãos, de forma que a estrutura da matriz extracelular permaneça para que sirva de suporte/plataforma. Lee et al (2014) mostraram resultados positivos para cultura e transplante de hepatócitos utilizando matriz descelularizada (LEE et al., 2014). Porém, uma desvantagem desse tipo de matriz é a dependência da doação de órgãos.

Apesar de recentes estudos trazerem novas abordagens utilizando biomateriais na regeneração hepática, eles necessitaram da adição de fatores exógenos para alcançarem o processo de reparo, como fatores de crescimento ou a necessidade de se adicionar a tais materiais células progenitoras. Os estudos atuais falham em estimular o desenvolvimento de uma estrutura morfofuncional do órgão na ausência de adição de fatores às plataformas propostas.

A matriz sintética de poliéter-poliuretano tem sido utilizada por nosso grupo de pesquisa como implante para análise da interação entre o organismo hospedeiro e o corpo estranho na cavidade subcutânea ou intraperitoneal de roedores. Estudos anteriores demonstraram que, na ausência de adição exógena de fatores de crescimento ou qualquer componente da matriz extracelular, os implantes subcutâneos tornam-se infiltrados por um tecido fibrovascular proliferativo. De forma semelhante, quando o implante foi realizado na região intraperitoneal, a matriz sintética mostrou-se firmemente aderido aos órgãos viscerais (fígado, intestino) contendo células parenquimatosas e não parenquimatosas desses órgãos (CASTRO et al., 2012; MENDES et al., 2007). Essas observações forneceram a ideia de que

esta matriz sintética poderia funcionar como uma plataforma bio-híbrida para indução de proliferação hepática.

2 JUSTIFICATIVA

Neste contexto, diversas lesões hepáticas, quando não tratadas adequadamente, favorecem a sua evolução estimulando o desenvolvimento de doença hepática grave, prejudicando a capacidade regenerativa (BLACHIER et al., 2013; CIENFUEGOS et al., 2014). Nestes casos, o desenvolvimento de fígados bioartificiais é considerada a principal abordagem terapêutica viável. O modelo de plataforma polimérica apresenta potencialidade para incluir a formação de um novo parênquima hepático capaz de restabelecer a morfofuncionalidade do órgão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a cinética dos componentes celulares e vasculares do parênquima hepático recém-formado, bem como determinar a produção de marcadores hepáticos (enzimas) utilizando uma plataforma polimérica.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir a formação de parênquima hepático em animais Swiss intra-implante, utilizando uma matriz sintética de poliéter-poliuretano, sob o lobo hepático esquerdo;
- Avaliar a proliferação do parênquima hepático nas matrizes sintéticas, nos dias 4, 8, 12 e 25 pós implante (histologia e imuno-histoquímica);

- Analisar a área de colágeno intra-implante (Picosirius) nos diferentes tempos avaliados;
- Realizar avaliação dos componentes vasculares do parênquima hepático intra-implante (contagem das veias centrolobulares);
- Avaliar a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG);
- Fazer dosagens dos níveis das citocinas TNF- α , VEGF e TGF- β 1 intra-implante nos diferentes tempos avaliados;
- Analisar os níveis de proteínas totais, albumina, AST e ALT, em amostras de soro de animais implantados e controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG), sob o Protocolo nº 264/2011 (Anexo A).

4.2 Animais

Utilizamos camundongos da linhagem Swiss, machos de aproximadamente 8 semanas de idade (n=10/grupo), fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os animais foram alimentados com ração padrão (NUVILAB CR-1 Brasil) e água *ad libitum* no biotério do Departamento de Patologia Geral, livre de patógenos e mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos realizados estavam de acordo com

os padrões estabelecidos nas diretrizes para o cuidado e uso de animais experimentais pelo Comitê Institucional de Bem-Estar Animal local.

4.3 Modelo experimental

As matrizes sintéticas de poliéter-poliuretano foram cortadas com o auxílio de um *punch* cirúrgico, em discos de 5 mm de espessura e 8 mm de diâmetro (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.), foram embebidas em álcool a 70% (*overnight*). Antes da implantação, os discos foram colocados em um béquer de vidro sobre uma placa aquecida e esterilizados por ebulição em água destilada durante trinta minutos (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987).

Todos os animais foram anestesiados com uma mistura de 60 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina. O pêlo abdominal dos animais foi tricotomizado e realizada a antissepsia da pele com álcool a 70%. As matrizes sintéticas foram implantadas na cavidade abdominal através de uma incisão da linha média ventral de 0,5 cm de comprimento, na linha alba do abdômen, abaixo do processo xifóide e inseridas sob o lobo esquerdo do fígado. O peso do órgão manteve o implante imobilizado, permitindo o contato direto entre o fígado e a matriz sintética, proporcionando assim uma interface: parênquima hepático/implante.

As incisões foram suturadas com fio de *nylon* não absorvível. Os animais foram mantidos isolados (um animal/caixa) e monitorados após a cirurgia para detectar quaisquer sinais de infecção ou desconforto.

Em intervalos de tempos predeterminados 04, 08, 12 e 25 dias após a implantação, grupos de animais foram eutanasiados por administração de uma sobredose de anestesia. Os implantes foram cuidadosamente dissecados a partir de tecido aderente, removidos, pesados e processados para as análises abaixo

descritas. A amostragem de sangue foi coletada para análise bioquímica. Os fígados e o sangue de um grupo controle (não implantados, n=10) também foram removidos e processados.

4.4 Análises histológicas e imunohistoquímicas

Os implantes foram fixados em 10% de formol por 24h, em seguida processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os cortes com espessura de 5 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para avaliar o parênquima hepático intra-implante. A coloração com Picrosirius seguida de microscopia de luz polarizada foi utilizada para visualizar e determinar fibras de colágeno. Um total de 30 campos/lâmina foram capturados com uma câmera digital JVC TK-1270/JCB conectada a um microscópio com uma amplificação final de 400 x para analisar os parâmetros descritos acima. Todos os parâmetros foram analisados pelo *software* Image Pro Plus 7.0.

Cortes histológicos também foram processados para imuno-histoquímica com o objetivo de avaliar a proliferação celular. Para isso, foram desparafinados, hidratados e submetidos a etapas de bloqueio subsequentes: bloqueio de peroxidase endógena com de H₂O₂ (0,3%) com metanol (1:1) durante 15 minutos e 5% de BSA durante 1 hora à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas *overnight* à temperatura ambiente com o anticorpo primário: anticorpo monoclonal de camundongo anti CDC-47 (1:300 - Neomarkers), seguido de incubação com Dako kit LINK e HRP-estreptavidina (1 hora cada). O cromógeno DAB foi usado para visualizar a atividade da peroxidase. Os cortes foram então contrastados com hematoxilina. O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

4.5 Determinação das atividades de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) intra-implante

A infiltração de neutrófilos nos implantes foi avaliada indiretamente por análise da atividade da MPO, como descrito anteriormente (PEREIRA et al., 2017) . Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4) e centrifugados a 12000 x g durante 10 min. A atividade de MPO nas amostras sobrenadantes foi determinada medindo a alteração na absorbância (densidade óptica; DO) a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM). A reação foi terminada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ (4M). Os resultados foram expressos como alteração na DO por g de tecido úmido. Os resultados foram expressos como mudança no DO / g de tecido úmido.

Quanto a infiltração de macrófagos nos implantes, foi avaliada indiretamente pelos níveis da enzima lisossômica NAG (ALMEIDA et al., 2017; ORELLANO et al., 2015; RODRIGUES VIANA et al., 2015). As amostras foram homogeneizadas em solução de NaCl (0,9% v / v) contendo 0,1% v / v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas (3.000 x g; 10 min a 4°C). As amostras do sobrenadante (100 µl) foram incubadas por 30 minutos a 37°C com 100 µl de p-nitrofenil-N-acetil-beta-D-glucosaminidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), preparados em tampão citrato / fosfato (Ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) para produzir uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de tampão de glicina a 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada medindo a absorção a 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol / mg de tecido úmido.

4.6 Dosagem do conteúdo de TNF- α , VEGF e TGF- β 1 intra-implante

O procedimento foi iniciado pela homogeneização dos implantes em PBS a um pH de 7,4 contendo 0,05% de Tween e centrifugados a 10.000 x g durante 30 minutos. As citocinas, TNF- α , VEGF e TGF- β 1 foram medidos em 100 μ l do sobrenadante utilizando kits de imunoenensaio (R e D Systems, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As diluições de sobrenadantes foram adicionadas a placas de ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra a citocina de interesse, seguindo-se a adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado com *horseradish peroxidase* (HRP).

Após a lavagem e remoção de qualquer reagente de anticorpo-enzima não ligado, adicionou-se aos poços uma solução de substrato (50 μ L de uma solução 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10mg/ml de tetrametilbenzidina em DMSO). O desenvolvimento de cor foi interrompido após 20 minutos de incubação com ácido sulfúrico 2N (50 μ L) e a intensidade de cor foi medida a 540 nm em um espectrofotômetro (E max - Molecular Devices). Os padrões utilizados para as diluições de 0,5 log₁₀ de citocinas murinas recombinantes de 7,5 pg/ml a 1000 pg/ml (100 μ l). Os resultados foram expressos como pg de citocina/mg de tecido úmido.

4.7 Função hepática

Para avaliar a função hepática, foram realizadas análises bioquímicas do soro dos camundongos. As enzimas Aspartato Aminotransferase Sérica (AST/SGOT), Alanina Aminotransferase (ALT/SGPT), proteínas totais e albumina foram dosadas em amostras de soro utilizando um Kit Bioclin (Copyright © 2012 Bioclin/Quibasa), conforme recomendações do fabricante.

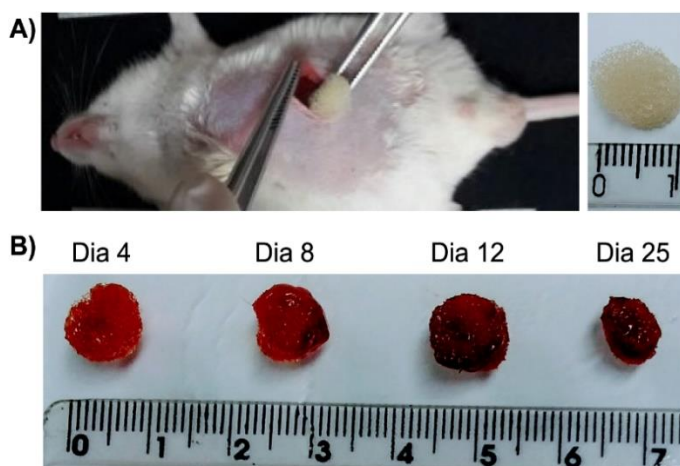
4.8 Análises estatísticas

Os resultados do trabalho são apresentados como média \pm SEM. A normalidade e homocedasticidade foram determinadas para posterior análise estatística. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0, através dos testes ANOVA unidirecional e comparação múltipla pós-teste Newman-Keuls. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Macroscopia e microscopia dos implantes

Macroscopicamente, não foi encontrado nenhum sinal de rejeição no local de implantação. A plataforma polimérica foi colocada sob o lobo esquerdo do fígado para criar uma interface entre a matriz sintética e o parênquima hepático (Fig. 6A). Imagens representativas dos implantes intraperitoneais revelaram que a matriz sintética foi integrada e infiltrada pelo fígado durante o tempo experimental (Fig. 6 B e C). O peso úmido dos implantes aumentou inicialmente, diminuindo no dia 25 pós-implantação (Fig. 6 B).



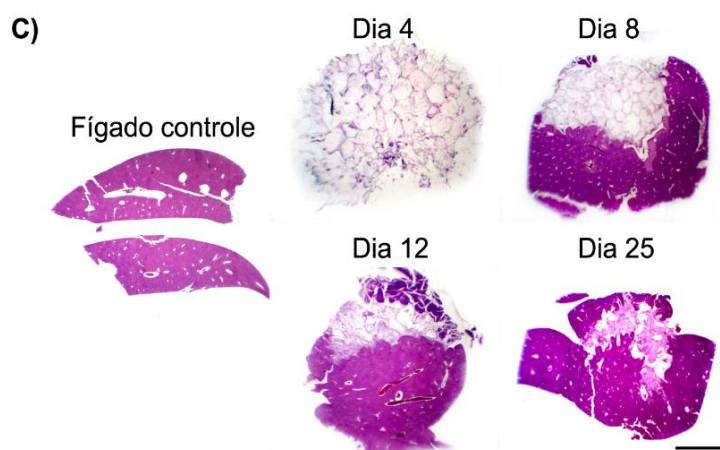


Figura 6 - Implantação de matriz sintética. A) Micrografia representativa da técnica de implantação em camundongos e da matriz sintética em detalhe; B) Imagem macroscópica da matriz sintética após a implantação (4, 8, 12 e 25 dias). C) Imagem microscópica da infiltração progressiva do fígado no implante (aumento de lupa – Barra = 0,5cm Hematoxilina-Eosina).

5.2 Proliferação hepática intra-implante

O implante da matriz de poliéter-poliuretano induziu a proliferação de um tecido fibrovascular seguido do desenvolvimento do parênquima hepático como mostrado pela coloração com H & E. Inicialmente (dia 4), o tecido recém formado foi composto de um denso infiltrado inflamatório, fibroblastos e células endoteliais formando microvasos (Figura 7 A).

No dia 8, agrupamentos de hepatócitos foram vistos dentro do implante, além de estruturas ductais e vasculares (Figura 7 B I-V). Para quantificar a infiltração do parênquima hepático no implante, medimos a área do parênquima hepático e o peso da matriz sintética (Figura 7 C e D). Estas características aumentaram progressivamente durante o período experimental, com redução do peso da matriz no dia 25. Interessantemente, o parênquima hepático proliferou no implante de forma organizada.

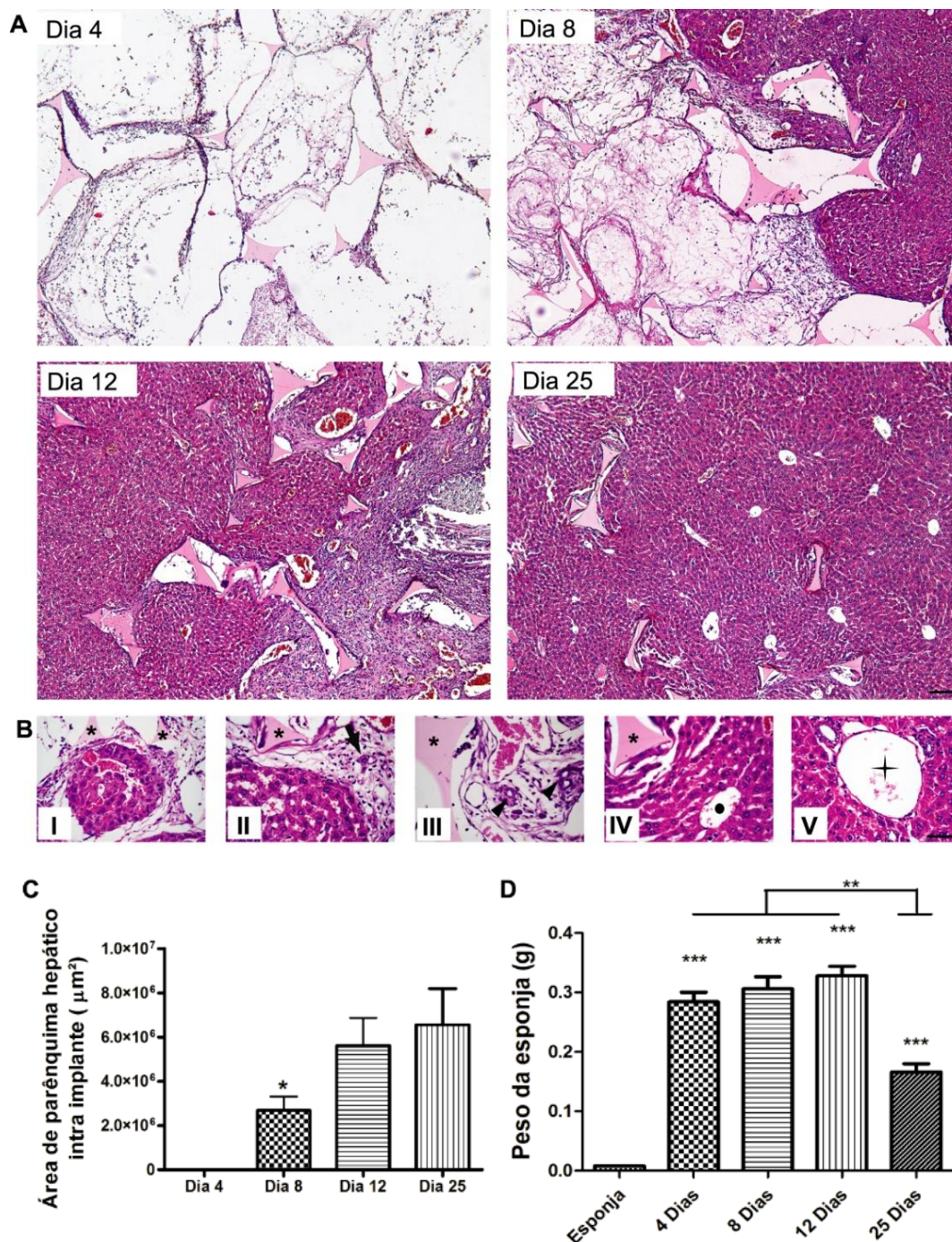


Figura 7 - Perfil da regeneração hepática na matriz sintética. Cortes histológicos representativos de implantes (matriz sintética de poliéter-poliuretano) removidas em intervalos de tempo pré determinados (4, 8, 12 e 25 dias). A infiltração progressiva do tecido hepático é vista no implante. B) I- grupo de hepatócitos dentro do implante; II- hepatócito individual (indicado pela seta) próximo da matriz sintética*; III- ductos biliares (indicados pela seta); IV- veia centrolobular (círculo preto); V- espaço porta (cruz); C) Área do parênquima hepático intra-implante. D) Valores de peso dos implantes úmidos. Os valores apresentados são expressos como média \pm SEM. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) *P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001; Barra = 100 μ m.

Avaliando a proliferação celular, observamos que diferentes células do fígado foram positivas para CDC47 (marcador de proliferação celular), tanto hepatócitos como células de Ito (estreladas), e também fibroblastos e células endoteliais (Figura 8 A-F). O número de células positivas para CDC47 foi maior no dia 8 e progressivamente menor nos dias 12 e 25 (Figura 8 G).

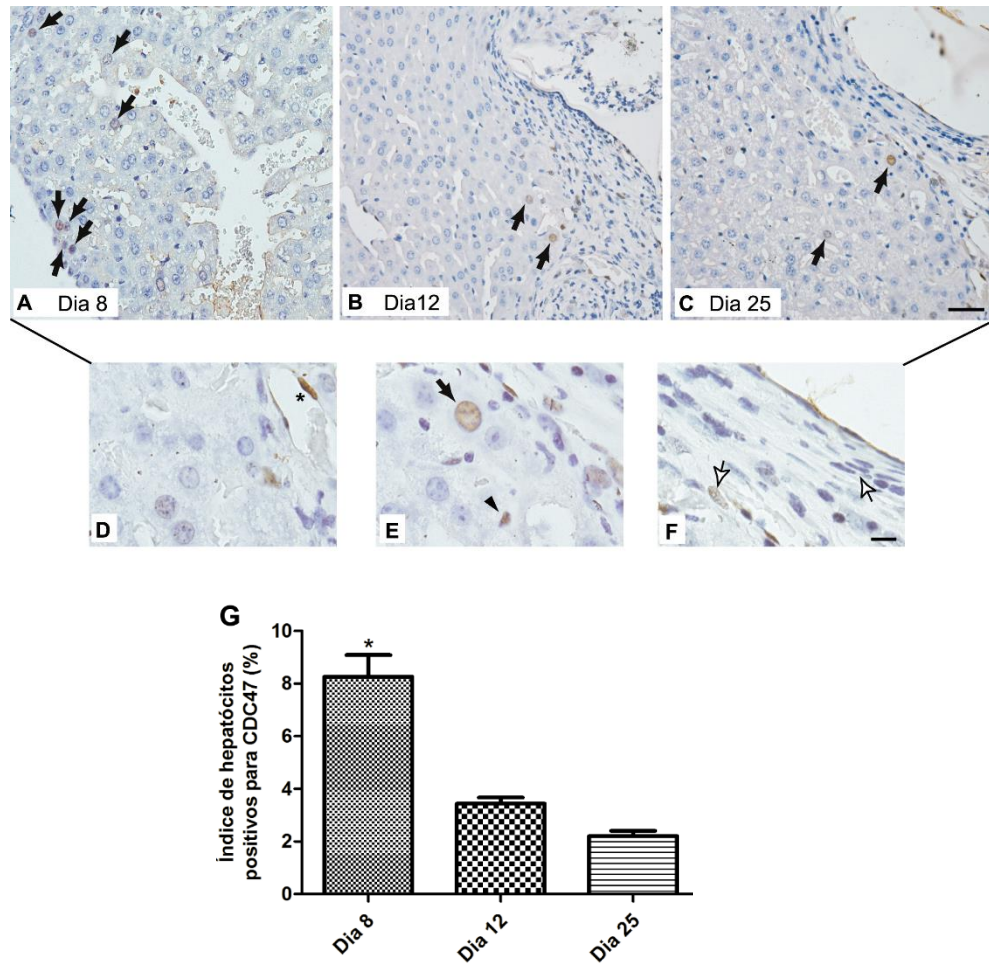


Figura 8 - Marcador de proliferação celular em cortes de implantes nos dias 8 (A), 12 (B) e 25 (C). Hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais e células de Ito foram positivas para o marcador de proliferação celular CDC47 por coloração imuno-histoquímica. D) Célula endotelial em detalhe*. E) Hepatócitos em detalhe (indicados pela seta) e células de Ito (indicadas pela seta). F) Fibroblastos em detalhe (indicados pela seta). G) Análise morfométrica da porcentagem de células positivas para CDC47 apresentou maior número de hepatócitos positivos para o anticorpo no dia 8, em comparação com os dias 12 e 25. Dados representam média \pm SEM para cada intervalo. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) *P < 0,05. (A-C: Barra = 50 μ m; D-E: Barra = 20 μ m).

5.3 Análise do colágeno intra-implante

A análise densitométrica do conteúdo de colágeno no parênquima recém-formado foi determinada usando coloração com Picrosirius e microscopia de luz polarizada (Figura 9 A e B). Observou-se um aumento inicial da deposição de colágeno (dia 8) pós implantação seguido por uma diminuição nos dias 12 e 25, atingindo os valores do fígado normal. (Figura 9 C).

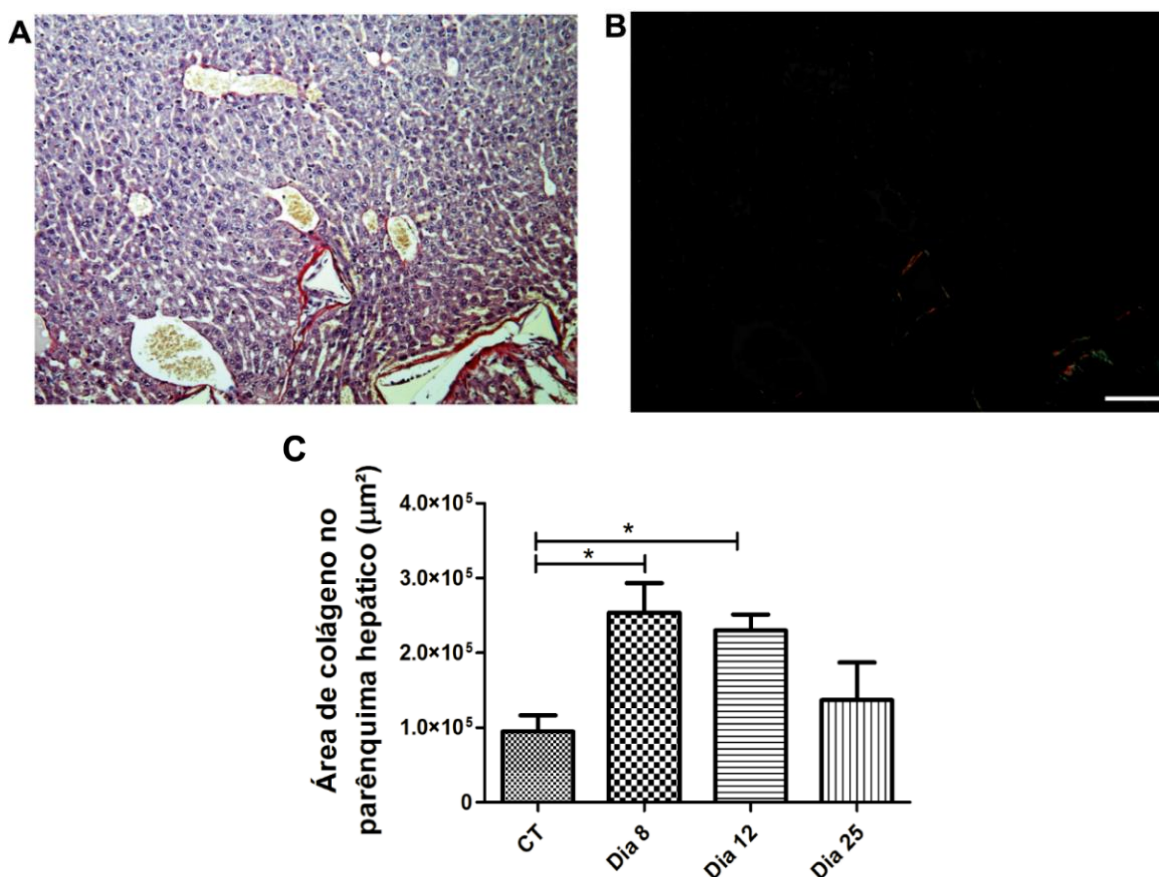


Figura 9 - Análise da área de colágeno intra-implante. A-B) Secção histológica representativa (coloração com Picrosirius) de deposição de colágeno no parênquima hepático; C) Análise morfométrica da deposição de colágeno. Os dados representam média ± SEM para cada intervalo * Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) * P <0,05. (Barra = 100 µm).

5.4 Análise de componentes vasculares do fígado recém-formado

As veias centrolobulares e portais foram observadas no tecido recém-formado. Houve um aumento progressivo nas veias centrolobulares durante o período

experimental. O valor médio no dia 25 foi semelhante ao controle do fígado (Figura 10)

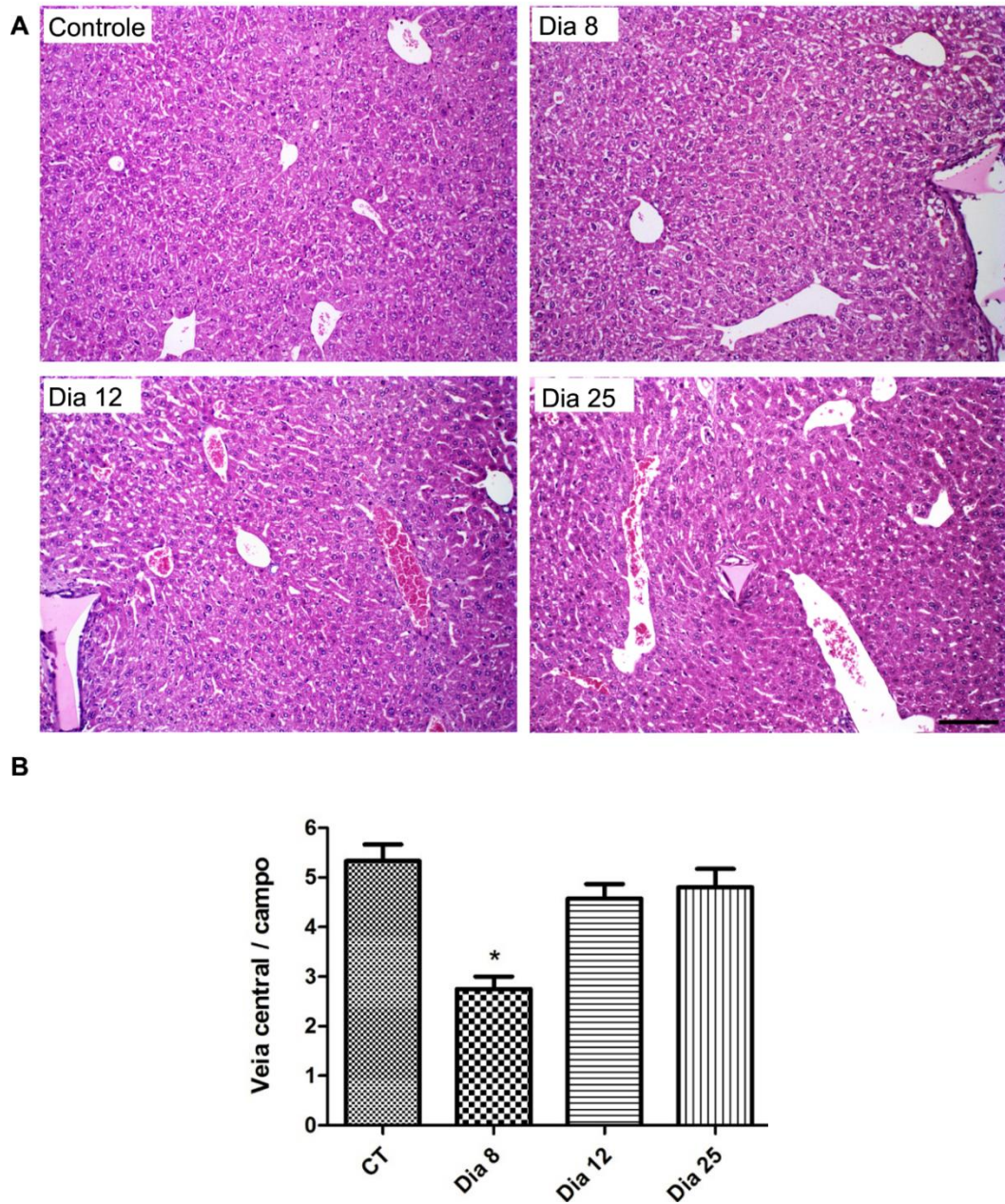


Figura 10 - Componentes vasculares do fígado recém formado. A) Seções histológicas representativas (HE) das veias centrolobulares no tecido hepático no controle do fígado (CT) e no parênquima hepático intra-implante (8, 12 e 25). B) Análise morfométrica do número das veias centrolobulares. Os dados representam média ± SEM para cada intervalo. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) *P <0,05. (Barra = 50 µm)

5.5 Dosagem dos níveis de NAG e MPO intra-implante

As atividades das enzimas inflamatórias MPO e NAG foram avaliadas (Figura 11 A e B). Observou-se diminuição da quantidade de MPO a partir do dia 8 até o final do tempo analisado, indicando menor atividade de neutrófilos no final do experimento. Quando avaliamos a atividade de NAG, observamos aumento no dia 25, o que estaria relacionado ao aumento de atividade de macrófagos nos implantes no final do experimento.

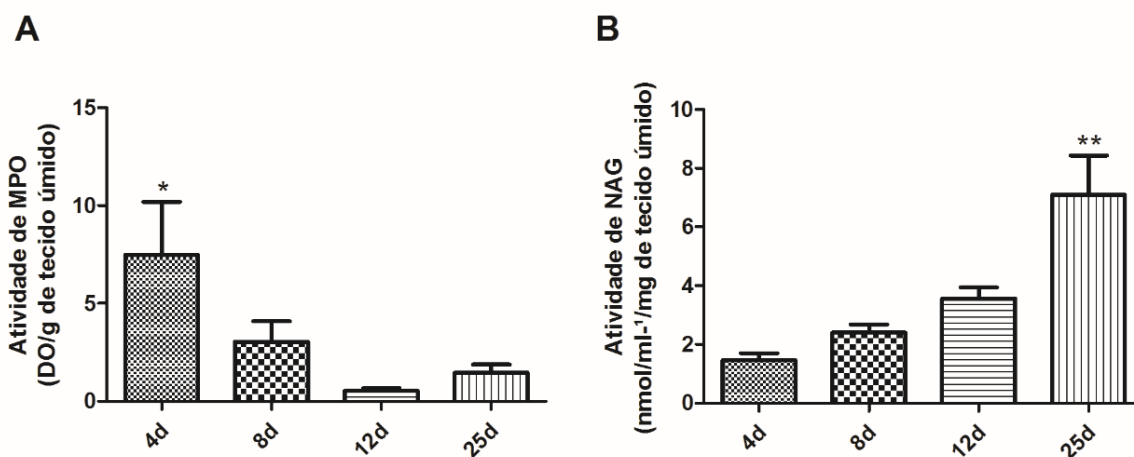


Figura 11 - Níveis de MPO e NAG intra-implante. A) Houve um aumento da atividade da enzima MPO no dia 4 e redução nos dias 8, 12 e 25 em relação ao dia 4. B) Os resultados demonstram que houve um aumento progressivo dos níveis da enzima NAG (4, 8, 12 e 25). Os dados representam média \pm SEM para cada intervalo. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) *P <0,05; ** P <0,01.

5.6 Dosagem do conteúdo de TNF- α , VEGF e TGF- β 1 intra-implante

A medição das citocinas, TNF- α , VEGF e TGF- β 1 nos implantes é mostrada nas Figura 12 (A-C). O pico da produção de TNF- α foi alcançado no dia 8 pós-implantação, com redução dos níveis no dia 25, retornando aos mesmos níveis do dia 4. Os níveis de VEGF atingiram o pico no dia 8 e nos tempos seguintes (12 e 25 dias) mostraram níveis menores comparados com os demais tempos avaliados. Os níveis de TGF- β 1 não foram significativamente diferentes durante o período experimental.

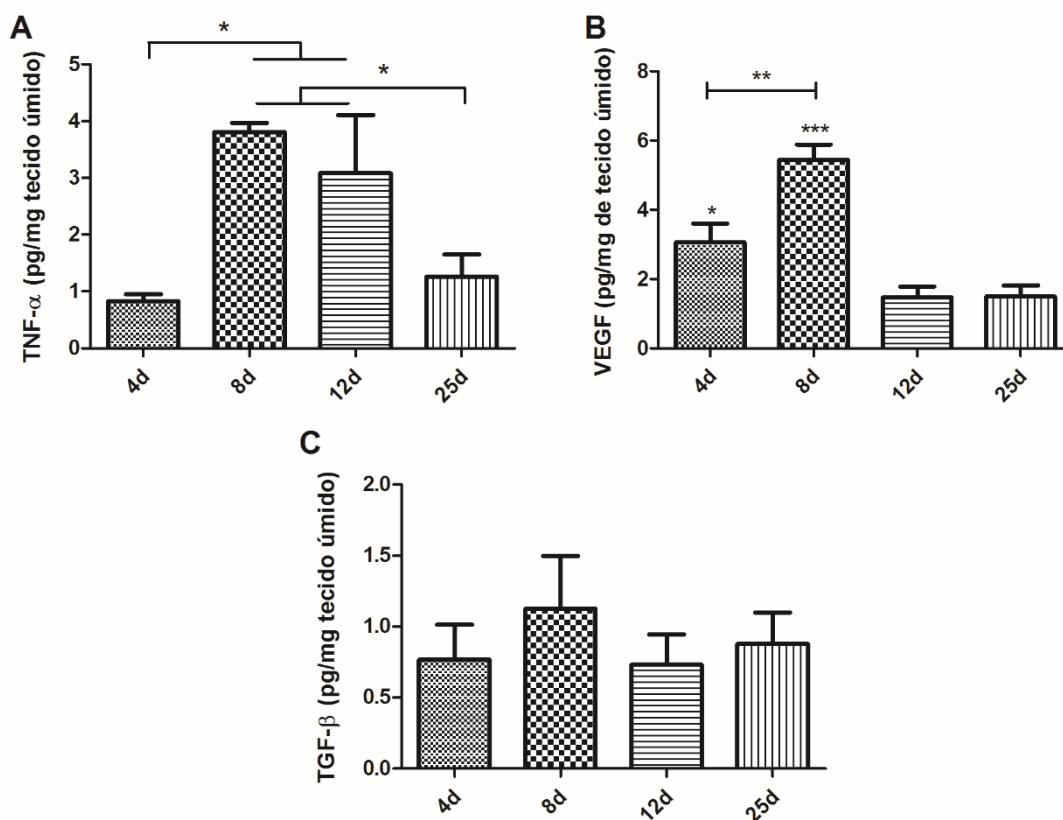


Figura 12 - Níveis de TNF- α e VEGF e TGF- β 1 intra-implante. Os níveis de TNF- α exibiram um padrão bifásico enquanto que os níveis de TGF- β 1 eram semelhantes em todos os tempos avaliados. Os níveis de VEGF apresentou um aumento no dia 4, progressão desse aumento no dia 8, mas houve diminuição considerável nos dias 12 e 25. Os dados representam média \pm SEM para cada intervalo. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) * P <0,05

5.7 Avaliação da função hepática

Avaliamos se o implante alteraria a função do órgão dosando Aspartato Aminotransferase Sérica (AST/SGOT), Alanina Aminotransferase (ALT/SGPT), proteínas totais e concentrações de albumina em diferentes pontos de tempo: dias 4, 8, 12 e 25 após implantação (Figura 13). Não houve diferença significativa nas concentrações séricas de proteína total, albumina e AST em ambos os grupos comparando os quatro pontos de tempo. A concentração de ALT no soro foi maior no dia 4, apenas em comparação com o soro de animais não implantados.

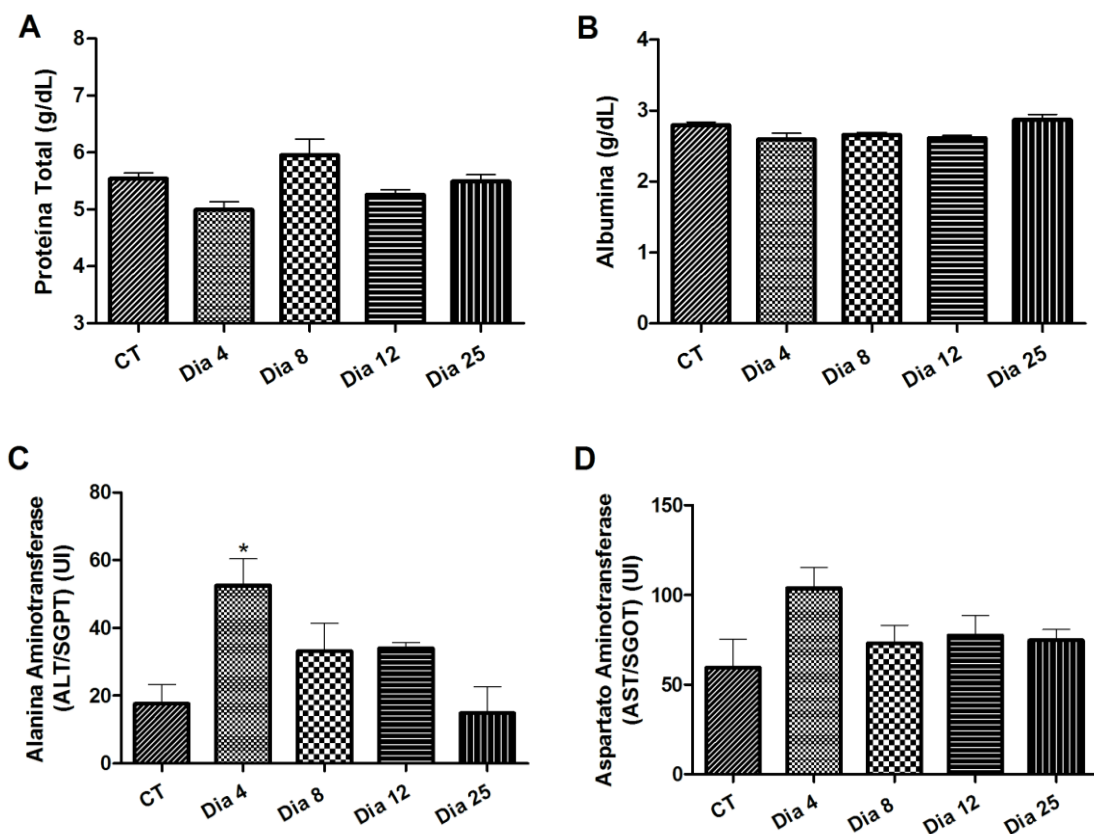


Figura 13 - Avaliação da função hepática. A) Concentração sérica de proteínas totais (g / dL); B) Concentração sérica de albumina (g/dL); C) Alanina Aminotransferase sérica (ALT/SGPT) (UI); D) Aminotransferase de Aspartato de Soro (AST/SGOT) (UI). Não houve diferença significativa na proteína total sérica, albumina e AST entre os tempos analisados. O ALT sérico aumentou no dia 4, mas retornou ao nível basal no dia 25. Os dados representam média \pm SEM para cada intervalo. *Diferença significativa entre os grupos (ANOVA) * $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O fígado apresenta uma característica única de reparo frente a lesões, porém pode apresentar resposta regenerativa insuficiente ou desenvolver respostas fibróticas que torna o órgão não funcional. Assim, a medicina regenerativa vem trabalhando para desenvolver novos modelos de estudo de regeneração baseados em microambientes controláveis, como os biomateriais (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011; PEREZ; JUNG; KIM, 2017). Os estudos recentes com animais que exploram a regeneração hepática são baseados em extensas lesões orgânicas através da

hepatectomia parcial ou da administração de produtos químicos prejudiciais (CCl₄, acetaminofeno) e associam plataformas para auxiliar a regeneração hepática acrescentadas de fatores externos, como fatores de crescimento, células progenitoras, componentes da MEC (HAMMOND et al., 2011b; LEE et al., 2014; LI et al., 2015). No entanto, a proliferação de parênquima hepático sem que haja uma lesão extensa e sem a adição de fatores externos não tem sido relatada.

No presente estudo, utilizamos o implante de uma plataforma porosa como modelo de proliferação hepática, definindo uma interface com o parênquima hepático do camundongo, fornecendo um estímulo para a migração sequencial e a proliferação do parênquima hepático para o interior da plataforma. Embora não exista ressecção hepática ou morte extensa de hepatócitos, o parênquima hepático conseguiu colonizar a matriz sintética formando uma estrutura semelhante a um fígado. Interessantemente, nenhum fator de crescimento exógeno ou componentes extracelulares foram adicionados ao implante. Importantes características deste nosso modelo de proliferação hepática (sem necessidade de fatores exógenos e minimamente invasivos) superam as desvantagens de outros modelos em que os implantes tiveram de ser carregados com fatores de crescimento únicos/múltiplos e componentes da matriz extracelular (HAMMOND et al., 2011a; TAKIMOTO et al., 2003). A adição de fatores de crescimento exógenos aos implantes é de valor limitado, devido à falta de informações sobre a dosagem e o tipo de fatores a serem carregados (HAMMOND et al., 2011a).

É provável que algumas características (tamanho do poro, arquitetura) de nossa matriz sintética proporcionem um microambiente adequado que permite a colonização do implante pelas células do fígado parenquimatosas e não

parenquimatosas. O diâmetro médio dos poros da matriz de poliéter-poliuretano foi de 474 μm , como relatado anteriormente (PEREIRA et al., 2017). Foi proposto que o tamanho do poro de um implante determina o sucesso do processo de vascularização pós-implantação, uma vez que diâmetros menores que 400 μm limitam o crescimento e o diâmetro dos vasos sanguíneos (FENG et al., 2011).

Além disso, o potencial para as células migrarem para a matriz porosa é influenciado pela sua natureza biofísica, por exemplo, o próprio biomaterial e sua arquitetura (HAMMOND et al., 2011b; VASANTHAN et al., 2012). Após o implante da matriz sintética de poliéter-poliuretano no fígado, não foi observada nenhuma disfunção hepática relevante durante a maior parte do período experimental, já que apenas no dia 4 pós implantação houve aumento da ALT sérica, retornando aos níveis do controle após o oitavo dia.

A análise histológica dos implantes demonstrou que o padrão de proliferação hepática observado se assemelha ao da proliferação normal do fígado. A migração celular (hepatócitos, células endoteliais, células de Ito) foi seguida pela geração de capilares sinusóides subsequentes e pela presença de canais biliares. Este desenvolvimento sequencial de tecido hepático é consistente com o observado após lesão hepática e/ou estímulo como descrito por Wack et al (2001) e Ross et al (2001) (ROSS et al., 2001; WACK, 2001).

A proliferação de hepatócitos dentro do implante sintético foi confirmada utilizando anticorpo monoclonal de camundongo anti CDC47. Este marcador de proliferação celular apresentou-se aumentado nos implantes do oitavo dia em comparação com os implantes de 12 e 25 dias. A proliferação celular no fígado tecido controle (sem implante) foi semelhante à encontrada nos implantes de 25 dias. Nossos resultados estão em concordância com o estudo de Ramalho et al (1993), que mostrou

que o processo regenerativo no fígado tem a duração de 7 a 14 dias (RAMALHO et al., 1993) .

O tecido recém-formado que infiltrava o implante foi inicialmente (dia 4) composto por uma matriz extracelular, infiltrado inflamatório denso, vasos sanguíneos de vários tamanhos e fibroblastos. Após o dia 8, foram identificados e quantificados o tecido hepático parenquimatoso e não parenquimatoso, incluindo os vários componentes vasculares (veias centrolobulares, espaço porta e capilares sinusoides). A indução de uma rede capilar em implantes é um pré-requisito e vantagem em qualquer dispositivo que envolve biomateriais (NISHIGUCHI et al., 2014).

A deposição de colágeno no tecido hepático deve ser adequada para não gerar uma resposta fibrótica, sendo um resultado indesejável de doenças crônicas hepáticas, o que resulta em perda de microvilosidades, redução do número e tamanho da fenestração de hepatócitos e menor síntese proteica (FRIEDMAN, 1993; HAHN et al., 1980; ROJKIND; GIAMBRONE; BIEMPICA, 1979). Avaliamos a deposição de colágeno no tecido que infiltrava o implante e não encontramos diferença significativa entre a quantidade de colágeno no fígado recém formado nos diferentes tempos avaliados (8, 12 e 25 dias), comparado ao controle. Assim, ocorreu a proliferação de um parênquima hepático saudável no implante, o que poderia ser explorado como uma forma de restaurar o parênquima normal em doenças fibróticas do fígado.

Vários fatores pró-inflamatórios e de crescimento (TNF α , IL-6, HGF, EGF) estão envolvidos no controle da regeneração hepática (MICHALOPOULOS, 2007). Desta forma, é provável que a reação inflamatória e sua resolução no local do implante e conseqüente produção de citocinas possam ter contribuído para a migração celular para a plataforma. De fato, o nível de atividade de MPO foi maior no dia 4 pós implantação, indicando maior atividade de neutrófilos no início do processo. No final

do experimento (dia 25) a atividade de MPO foi reduzida, o que também coincide com o menor peso das esponjas no dia 25, indicando resolução do processo inflamatório. Além disso, a atividade de NAG foi maior no último tempo avaliado (25 dias) indicando uma maior atividade de macrófagos. Tais células são conhecidas pela sua plasticidade na função que exercem no processo inflamatório, atuando inicialmente como pró-inflamatórias e posteriormente como anti-inflamatórias (STOUT et al., 2005). Esta plasticidade também é observada nos processos inflamatórios no fígado, com atuação do macrófago na fase resolutive do processo inflamatório (POSSAMAI et al., 2014). You et al (2013) mostraram que animais sem macrófagos apresentaram atraso no processo de reparo do fígado lesado (YOU et al., 2013). Assim, sugerimos que a maior atividade de NAG no dia 25 indique a participação de macrófagos resolutivos no processo de proliferação hepática em nosso modelo, e ressaltamos que mais avaliações são necessárias para confirmarmos a atuação de tais células no processo.

Os níveis de citocinas inflamatórias, angiogênicas e fibrogênicas importantes para o processo, TNF- α , VEGF e TGF- β 1, respectivamente, foram avaliados no implante. A produção de TNF- α exibiu um perfil bifásico, ou seja, houve um pico no dia 8, seguido de uma diminuição no dia 25. Isto indica que esta citocina modulou o processo de proliferação hepática em um padrão controlado, o que é consistente com o papel bem estabelecido do TNF- α em outros modelos de regeneração hepática (MCMAHAN et al., 2013; MOHAMMED et al., 2004). O nível de VEGF apresentou um pico no dia 8, o que está de acordo com o menor número de veias centrolobulares observado nesse mesmo tempo e coincidiu com o pico de proliferação de hepatócitos. De fato, hepatócitos em proliferação sintetizam VEGF, que por sua vez estimula os receptores (VEGFR) em células endoteliais induzindo-as a produzir HGF. Essa

sinalização permite a proliferação e organização de células endoteliais entre os hepatócitos em proliferação, formando canais vasculares, restaurando a estrutura vascular do fígado regenerado (MICHALOPOULOS, 2013; TAKI-ELDIN et al., 2012). TGF- β 1 é uma das citocinas mais importantes que induzem a fibrose hepática. É também um dos inibidores mais potentes da proliferação de hepatócitos. Nossos achados demonstram que os níveis de TGF- β 1 nos implantes foram semelhantes em todos os tempos avaliados. É possível que a produção constante desta citocina esteja envolvida na atividade proliferativa de células parenquimatosas e não parenquimatosas e no controle de deposição da matriz extracelular no implante (RÓKUSZ et al., 2017).

Vários tipos de plataformas sintéticas carregadas com fatores de crescimento e/ou componentes extracelulares provaram ser dispositivos biocompatíveis úteis para induzir a proliferação hepática (HAMMOND et al., 2011a; HOU; BANKA; SHAKESHEFF, 2004; KIM et al., 2010). No entanto, usando o nosso sistema bio-híbrido polimérico, demonstramos o desenvolvimento de componentes hepáticos parenquimatosos e não parenquimatosos sem a necessidade de fatores de crescimento exógenos. Além disso, nenhuma incisão cirúrgica para o fígado foi necessária para o implante da matriz sob o lobo esquerdo do órgão. Este modelo tem potencial para investigar mecanismos fisiológicos de proliferação hepática, pois ocorreu na ausência de ressecção hepática ou toxicidade.

7 CONCLUSÃO

O nosso modelo de matriz, sem aditivos exógenos, em interface com o fígado, foi capaz de induzir a proliferação de um fígado fisiológico, mantendo características morfofuncionais observadas no fígado controle. Vale destacar que a nossa plataforma

bio-híbrida superou limitações de outros trabalhos, os quais adicionam às suas matrizes sintéticas componentes da MEC ou fatores de crescimento, que fazem ressecções extensas ao órgão e utilizam fármacos hepatotóxicos. Portanto, sob esta perspectiva, concluímos que o nosso modelo apresenta potencial para investigar mecanismos fisiológicos de proliferação hepática.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, R. D. et al. Silk as a Biomaterial to Support Long-Term Three-Dimensional Tissue Cultures. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 34, p. 21861–21868, 31 ago. 2016.

ACHARYA, S. K. et al. Fulminant hepatitis in a tropical population: Clinical course, cause, and early predictors of outcome. **Hepatology**, v. 23, n. 6, p. 1448–1455, 1996.

ALMEIDA, S. A. DE et al. Murine strain differences in inflammatory angiogenesis of internal wound in diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 715–724, fev. 2017.

ANDRADE, S. P.; FAN, T. P.; LEWIS, G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British journal of experimental pathology**, v. 68, n. 6, p. 755–66, dez. 1987.

BLACHIER, M. et al. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 593–608, mar. 2013.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 9ª ed. [s.l: s.n.].

CASTRO, P. R. et al. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. **Microvascular Research**, v. 84, n. 1, p. 9–15, jul. 2012.

CIENFUEGOS, J. A. et al. Liver regeneration--the best kept secret. A model of tissue injury response. **Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva**, v. 106, n. 3, p. 171–94, mar. 2014.

CORLESS, J. K. Normal Liver Function. **Archives of Internal Medicine**, v. 143, n.

12, p. 2291, 1 dez. 1983.

DYSON, J. K.; ANSTEE, Q. M.; MCPHERSON, S. Republished: Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. **Postgraduate Medical Journal**, v. 91, n. 1072, p. 92–101, 5 fev. 2015.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43, n. S1, p. S45–S53, fev. 2006.

FENG, B. et al. The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture *in vivo*. **Biomedical Materials**, v. 6, n. 1, p. 15007, 2011.

FOX, A. N.; BROWN, R. S. Is the Patient a Candidate for Liver Transplantation? **Clinics in Liver Disease**, v. 16, n. 2, p. 435–448, 2012.

FRIEDMAN, S. L. The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis -- Mechanisms and Treatment Strategies. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 25, p. 1828–1835, 24 jun. 1993.

FUJIYOSHI, M.; OZAKI, M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences**, v. 18, n. 1, p. 13–22, jan. 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. [s.l.: s.n.].

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. [s.l.: s.n.].

HAHN, E. et al. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. **Gut**, v. 21, n. 1, p. 63–71, 1980.

HAMMOND, J. S. et al. Scaffolds containing growth factors and extracellular matrix induce hepatocyte proliferation and cell migration in normal and regenerating rat liver. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 279–287, fev. 2011.

HARDIN, B. L., J. Carbon Tetrachloride Poisoning-a Review. **Industrial Medicine and Surgery**, n. 3, p. 93–105, 1954.

HIGGINS, G.; ANDERSON, R. Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch Pathol.**, v. 12, p. 186–202, 1931.

HOU, Q.; BANKA, P. A. DE; SHAKESHEFF, K. M. Injectable scaffolds for tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 13, p. 1915–1923, 2004.

KAPLAN, W. **Priority Medicines for Europe and the World “ A Public Health Approach to Innovation ” Update on 2004 Background Paper Background Paper 6 . 12 Osteoarthritis**. Disponível em:

<http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_14Alcohol.pdf>. Acesso em: 1 jan. 2017.

KIM, M. et al. Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3596–3603, maio 2010.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487–492, 2004.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. May, p. 920–926, 1993.

LEE, J. S. et al. Liver Extracellular Matrix Providing Dual Functions of Two-Dimensional Substrate Coating and Three-Dimensional Injectable Hydrogel Platform for Liver Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 1, p. 206–218, 13 jan. 2014.

LI, P. et al. Promoting the Recovery of Injured Liver with Poly (3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate-Co-3-Hydroxyhexanoate) Scaffolds Loaded with Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering Part a**, v. 21, n. 3–4, p. 603–

615, 2015.

MCMAHAN, R. S. et al. A disintegrin and metalloproteinase 17 regulates TNF and TNFR1 levels in inflammation and liver regeneration in mice. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 1, p. G25–G34, 2013.

MENDES, J. B. et al. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 83B, n. 2, p. 408–415, nov. 2007.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 286–300, nov. 2007.

MICHALOPOULOS, G. K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

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

MICHALOPOULOS, G. K.; DEFRANCES, M. C. Liver regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5309, p. 60–6, 4 abr. 1997.

MILLER, D. J. et al. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. **Gastroenterology**, v. 71, n. 1, p. 109–13, jul. 1976.

MOHAMMED, F. F. et al. Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. **Nature genetics**, v. 36, n. 9, p. 969–977, 2004.

MOKDAD, A. A. et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 145, 18 dez. 2014.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 4, p. 383–417, 1 nov. 2011.

NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. 5. ed. [s.l: s.n.].

NISHIGUCHI, A. et al. Effects of angiogenic factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich cultures. **Biomaterials**, v. 35, n. 17, p. 4739–4748, 2014.

ORELLANO, L. A. A. et al. Angiopreventive versus angiopromoting effects of allopurinol in the murine sponge model. **Microvascular Research**, v. 101, p. 118–126, set. 2015.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction**. [s.l: s.n.].

PEREIRA, L. X. et al. Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration. **Life Sciences**, v. 176, p. 67–74, maio 2017.

PEREZ, R. A.; JUNG, C.-R.; KIM, H.-W. Biomaterials and Culture Technologies for Regenerative Therapy of Liver Tissue. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 2, p. 1600791, jan. 2017.

POSSAMAI, L. A. et al. Modulation of monocyte/macrophage function: A therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 2, p. 439–445, ago. 2014.

RAMALHO, F. S. et al. Liver regeneration: some definitions in an universe of doubts. **Acta cir. bras**, v. 8(4), p. 177–89, 1993.

RATNER, B. D. A pore way to heal and regenerate : 21st century thinking on biocompatibility. n. February, p. 107–110, 2016.

RIEHLE, K. J. et al. New Concepts in Liver Regeneration. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. Suppl 1, p. 203–212, 2011.

RODRIGUES VIANA, C. T. et al. Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0130809, 9 jul. 2015.

ROGERS, A. B.; DINTZIS, R. Z. Liver and Gallbladder. In: TREUTING, P. M. et al. (Eds.) **Comparative Anatomy and Histology - A Mouse and Human Atlas**. [s.l.: s.n.]. p. 193–201, 2012.

ROJKIND, M.; GIAMBRONE, M. A.; BIEMPICA, L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. **Gastroenterology**, v. 76, n. 4, p. 710–9, abr. 1979.

RÓKUSZ, A. et al. Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–15, 2017.

ROSS, M. A. et al. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. **Hepatology**, v. 34, n. 6, p. 1135–1148, 2001.

SATTAR, N.; FORREST, E.; PREISS, D. Non-alcoholic fatty liver disease. **BMJ**, v. 349, n. sep19 15, p. g4596–g4596, 19 set. 2014.

STOUT, R. D. et al. Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 342–349, 2005.

STRAUSS, E. Falência hepática aguda. **Sociedade Brasileira de Hepatologia**, 2011.

TAKI-ELDIN, A. et al. Liver Regeneration after Liver Transplantation. **European Surgical Research**, v. 48, n. 3, p. 139–153, 2012.

TAKIMOTO, Y. et al. De Novo Liver Tissue Formation in Rats Using a Novel Collagen-Polypropylene Scaffold. **Cell Transplantation**, v. 12, n. 4, p. 413–421, 1 jan. 2003.

VASANTHAN, K. S. et al. Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 742–752, maio

2012.

WACK, K. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 363–378, fev. 2001.

WEI, W. et al. Rodent Models and Imaging Techniques to Study Liver Regeneration. **European Surgical Research**, v. 54, n. 3–4, p. 97–113, 2015.

WHO. **Hepatitis**. Disponível em: <<http://www.who.int/hepatitis/en/>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

WHO. **Hepatitis C**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION GLOBAL GUIDELINES.

Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/naflid-nash-english-2012.pdf>>. Acesso em: 1 jan. 2017.

YOU, Q. et al. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 836–843, set. 2013.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 264/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação morfométrica da regeneração hepática em modelo murino de implante de biomaterial**", que tem como responsável(is) **Paula Peixoto Campos Lopes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 03/2012**.

Este certificado expira-se em **14/ 03/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 264/2011**, related to the project entitled "**Evaluation morfometric of hepatic regeneration in a murine biomaterial implant model**", under the supervisors of **Paula Peixoto Campos Lopes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 16 de Março de 2012.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

9.2 ANEXO B – Artigo publicado na Revista Life Sciences

Accepted Manuscript

Induction of liver proliferation using a polymeric platform in mice

Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, Luciana Xavier Pereira, Celso Tarso Rodrigues Viana, Laura Alejandra Ariza Orellano, Simone Aparecida de Almeida, Anilton Cesar Vasconcelos, Giani Barbosa Ribeiro, Leticia Chinait Couto, Silvia Passos Andrade, Paula Peixoto Campos



PII: S0024-3205(17)30556-8
DOI: doi:[10.1016/j.lfs.2017.10.040](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.040)
Reference: LFS 15409
To appear in: *Life Sciences*
Received date: 13 September 2017
Revised date: 17 October 2017
Accepted date: 29 October 2017

Please cite this article as: Marcela Guimarães Takahashi de Lazari, Luciana Xavier Pereira, Celso Tarso Rodrigues Viana, Laura Alejandra Ariza Orellano, Simone Aparecida de Almeida, Anilton Cesar Vasconcelos, Giani Barbosa Ribeiro, Leticia Chinait Couto, Silvia Passos Andrade, Paula Peixoto Campos, Induction of liver proliferation using a polymeric platform in mice. The address for the corresponding author was captured as affiliation for all authors. Please check if appropriate. *Lfs*(2017), doi:[10.1016/j.lfs.2017.10.040](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.10.040)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Induction of liver proliferation using a polymeric platform in mice

Marcela Guimarães Takahashi de Lazari¹, Luciana Xavier Pereira¹, Celso Tarso Rodrigues Viana¹, Laura Alejandra Ariza Orellano¹, Simone Aparecida de Almeida¹, Anilton Cesar Vasconcelos¹, Giani Barbosa Ribeiro, Leticia Chinait Couto¹, Silvia Passos Andrade², Paula Peixoto Campos¹

¹Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

* Corresponding Author

E-mail address. PhD. Paula P. Campos. Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: 55+31+34093038, Fax: +55 31 34092924.
E-mail: paulapc@icb.ufmg.br.

Financial support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Trial registration number: protocol number 264/2011 CEUA

Abstract

Aims: Currently, animal models of liver regeneration are based on extensive lesions of the native organ and on cellular approaches using biomaterials to host growth factors and extracellular components to create artificial liver systems. We report a polymeric biological platform, minimally invasive, that induced sequential proliferation of liver parenchyma inside the scaffold in mice.

Main methods: Porous discs of polyether-polyurethane were surgically placed under the left liver lobe and removed at days 4, 8, 12 and 25 after implantation. No exogenous growth factors or extracellular matrix components were added to the scaffold. Histological analysis of the implants was performed to identify hepatocytes, liver vascular structures and bile ducts in the newly formed tissue. In addition, systemic markers for hepatic function were determined.

Key findings: This biohybrid device provided a scaffold that was gradually filled with parenchymal and non-parenchymal liver tissue as detected by histological analysis. At day 4, the pores of the scaffold were filled with inflammatory cells and spindled-shaped like fibroblasts, and extracellular matrix components. At day 8, hepatocytes clusters, central lobular hepatic veins, portal space containing arteries, veins and biliary ducts were detected. By days 12 and 25 a liver-like structure filled 2/3 of the scaffold. Its organization resembled that of a mature liver. Serum concentration of ALT increased three-fold initially after implantation, returning gradually to control levels.

Significance: The plain synthetic scaffold (without addition of exogenous molecules) placed under the intact left liver lobe exhibits the potential to investigate physiological mechanisms that regulate liver parenchyma proliferation.

Key words: scaffold, liver parenchyma, proliferation, animal model.

1 Introduction

Liver regeneration is a well-established process in mammals in which the organ/body weight ratio returns to 100% of the original dimension takes place after partial hepatectomy or other injuries [1]. Hepatocytes, the main functional cells of the liver, manage to proliferate to restore mass and simultaneously to deliver all hepatic functions necessary to maintain body homeostasis. They are the first cells to respond to regenerative stimuli triggered by mitogenic growth factor receptors MET (the hepatocyte growth factor receptor) and epidermal growth factor receptor and complemented by auxiliary mitogenic signals induced by other cytokines [2–6]. A number of different approaches using in vitro systems, as well as animal models has been established including the rodent liver resection or administration of damaging chemicals (CCl₄, acetaminophen, etc.) [7–9]. Surgery, which includes partial hepatectomy and portal vein occlusion, leads to compensatory regeneration of the remnant liver lobe or compensatory regeneration of the contralateral lobe. The administration of hepatotoxic chemicals results in the death of liver cells and in subsequent hepatic regeneration and tissue repair [10]. The use of these rodent's models has provided the basis into understanding mechanisms and molecular signals that control regeneration of severe damaged liver. Alternative cellular approaches using biomaterials to host growth factors and/or extracellular components have been developed to provide animal models of liver regeneration. This has been achieved by means of intrahepatic delivery of growth factors via systemic or portal vein infusion or by incorporating extracellular matrix components and/or growth factors in biodegradable polymer scaffolds implanted directly into normal or regenerating hepatic parenchyma [11–13]. In those studies, it has been reported that the cells migrated into the porous of the scaffold sequentially. Hepatic stellate cells were the first to migrate

and deposit ECM. Then, the scaffolds became vascularized and non-parenchymal cell proliferated within the implants. However, in those studies the use of scaffolds alone (without ECM or growth factors) has been reported to be unable to induce expressive liver tissue penetration, implying that there are limitations in the manufacturing and assembling of growth factor-loaded scaffolds applied to liver regeneration. Thus, it seems that none of these approaches fulfills all requirements to make liver cells successfully colonize the scaffolds.

We have used synthetic matrix of polyether-polyurethane as the implanted scaffold to analyze the interaction between the host and the foreign material in the subcutaneous or peritoneal cavity of rodents. In a previous publication, we showed that in the absence of exogenous addition of growth factors or extracellular matrix components, the subcutaneous implants become infiltrated by a proliferative fibrovascular tissue containing skin or skeletal muscle fibers and enveloped by a fibrous capsule 8 days after implantation. In a similar manner, the intraperitoneal implant of the synthetic matrix was shown to become firmly adhered to visceral organs (liver or intestines or muscles) containing parenchymal and non-parenchymal cells from these organs [14,15]. These observations provided the idea of a biohybrid scaffold that integrated the biomaterial with the surrounding environment. Since no extensive damage of the internal organs has been observed using this procedure we reasoned that this polymeric platform could be further exploited to establish the morphofunctionability of newly induced liver parenchyma. This would in turn provide a new model to investigate liver proliferation in which no resection or toxicity has been inflicted to the organ. Thus, the aim of this investigation was to characterize the kinetics of the vascular and cellular components of the newly formed hepatic tissue, as well as to determine the production of liver markers (enzymes) using this polymeric platform.

2 Material and Methods

2.1 Animals

The Ethics Committee of Animal Use (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais, (protocol number 264/2011) approved all animal procedures. We used 8-week-old male Swiss mice (n=10/group) provided by Centro de Bioterismo (CEBIO) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). All mice were provided with standard chow pellets (NUVILAB CR-1 Brazil) and water *ad libitum* in our pathogen-free facility, and maintained under a 12-hour light/dark cycle. All animal procedures were in accordance with the standards set forth in the guidelines for the care and use of experimental animals by our local Institutional Animal Welfare Committee.

2.2 Experimental design

Synthetic polyether-polyurethane matrices in disc format, 5 mm thick x 8 mm in diameter (Vitafoam Ltd, Manchester, U.K.), were soaked overnight in 70% ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 30 min prior to implantation [16].

All animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (60 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). The abdominal hair was shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The scaffolds were aseptically implanted inside the abdominal cavity through a 0.5 cm long ventral midline incision in the line alba of the abdomen and placed under the left liver lobe. The weight of the organ kept the scaffold immobilized allowing direct contact between the liver and the synthetic matrix, thus providing an interface: hepatic parenchyma/scaffold. The incisions were closed with silk braided non absorbable suture. The animals were kept isolated (one animal/cage) and monitored post-surgery for any signs of infection or discomfort.

At intervals of predetermined times - 04, 08, 12 and 25 days post implantation, groups of animals were euthanized by administration of an overdose of anesthetic. The implants were carefully dissected from adherent tissue, removed, weighed and processed for assays described below. Blood sampling was collected to biochemical analysis. Livers and blood from a control group (non-bearing implant n=10) were also removed and processed.

2.3 Histological and immunohistochemistry analysis

The implants were fixed in 10% formol for 24h. After paraffin inclusion, sections with 5-mm thickness were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to evaluate the hepatic parenchyma intra implant. Picrosirius-red staining followed by polarized-light microscopy was used to visualize and determine collagen fibers. A total of 30 fields/slide were captured with a digital camera JVC TK-1270/JCB connected to a microscope with a magnification of x 400 to analyze the parameters described above. All parameters were analyzed by Image Pro Plus 7.0 software.

Other sections were processed for immunohistochemistry to assess the cell proliferation. They were deparaffinized, hydrated, and submitted to subsequent blocking steps: endogenous peroxidase block with 30% H₂O₂: methanol (1:1) for 15 minutes and 5% BSA for 1 hour at ambient temperature. The slides were then incubated overnight at room temperature with the primary antibody: mouse monoclonal antibody anti CDC-47 (1:300 - Neomarkers), followed by incubation with Dako kit LINK and HRP-streptavidin (1 hour each). DAB chromagen was used to visualize the peroxidase activity. Sections were then counterstained with hematoxylin. The negative control was performed by omitting the primary antibody.

2.4 Liver function

Biochemical analyses of the animal serum were carried out to assess the liver function. Serum aspartate aminotransferase (AST/SGOT), Alanine Aminotransferase (ALT/SGPT), total proteins and albumin were measured in serum samples using a Bioclin Kits (Copyright © 2012 Bioclin/Quibasa) according to manufacturer's protocol.

2.5 Measurement of TNF- α and TGF- β 1 content of the scaffold

Implants were homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween and centrifuged at 10,000 x g for 30 min. The cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and Transforming growth factor beta (TGF- β 1) were measured in 100 μ l of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) and following the manufacturer's protocol. Dilutions of cell-free supernatants were added to ELISA plates coated with a specific murine monoclonal antibody against cytokine, followed by adding a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50 μ L of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10mg/ml in DMSO) was added to the wells. Color development was stopped after 20 min incubation with 2N sulphuric acid (50 μ L) and color intensity was measured at 540 nm on a spectrophotometer (E max – Molecular Devices). Standards were 0.5-log₁₀ dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5 pg/ml to 1000 pg/ml (100 μ l). The results were expressed as pg of cytokine/mg of wet tissue.

2.6 Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. The assumptions of normality and homoscedasticity were determined for subsequent statistical analysis. Statistical analysis

was performed using the GraphPad Prism 5.0 software, by One-way ANOVA and post-test Newman-Keuls Multiple Comparison. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Gross appearance and microscopic examination of the implants

Macroscopically, no signs of rejection were observed at the site of implantation. The scaffold was placed under the liver left lobe to create an interface between the synthetic matrix and the hepatic parenchyma (Fig. 1A). Representative images of intraperitoneal implants revealed that the synthetic matrix was integrated and infiltrated by the liver over the experimental time (Fig. 1B and C).

3.2 Hepatic proliferation intra-implant

The scaffold of the polyether-polyurethane matrix induced proliferation of a fibrovascular tissue followed by hepatic parenchyma development as shown by H&E staining. Initially (day 4), the newly formed tissue was composed of a dense inflammatory infiltrate, spindle-shaped like fibroblasts and proliferating endothelial cells forming microvessels (Fig. 2A)

By day 8, clusters of hepatocytes were seen inside the scaffold. (Fig. 2 B). To quantify the infiltration of hepatic parenchyma into the implant, we measured the area of hepatic parenchyma and the sponge weight (Fig.2 C and D). These features increased progressively during the experimental period, with reduction of sponge weight at 25 day. Interestingly, hepatic parenchyma proliferated into the synthetic matrix in an organized manner.

Liver cells were positive for CDC47 (cell proliferation marker) (Fig. 3 A-C). The number of CDC47-positive cells was higher at day 8 and progressively lower at days 12 and 25 (Fig. 3D).

3.3 Collagen analysis

Densitometric analysis of collagen content in the newly formed parenchyma was determined using Picrosirius staining and polarized light microscopy (Fig. 4 A and B). An initial increase in collagen deposition was observed (day 8) post implantation followed by a decrease at days 12 and 25, reaching the values of normal liver. (Fig.4 C).

3.4 Vascular components analysis of the newly formed liver

Central and portal veins were seen in the newly formed tissue (Fig 5 A) . There was a progressive increase in central veins during the experimental period. The mean value at day 25 was similar to the control liver (Fig. 5B)

3.5 Hepatic Function

We assessed whether the scaffold would alter the organ function by measuring serum Aspartate Aminotransferase (AST/SGOT), Alanine Aminotransferase (ALT/SGPT), total proteins and albumin concentrations at different time points: days 4, 8, 12 and 25 after implantation (Fig.6). There were no significant differences in serum total protein, albumin and AST concentrations in both groups comparing the four-time points. The serum ALT concentration was higher at day 4 only compared with serum from non-scaffold bearing animals.

3.6 Cytokine levels in the scaffold

The measurement of the cytokines, TNF- α and TGF- β 1 in the sponge implants is shown in Fig. 7 A and B. The peak production of TNF- α was achieved at day 8 post-implantation, falling to the levels of 4-day old implants at day 25 post-implantation. The levels of TGF- β 1 were not different during the experimental period examined.

4 Discussion

The current animal models to study liver regeneration are based on extensive lesions of the native organ by means of partial hepatectomy or administration of damaging chemicals (CCl₄, acetaminophen, etc.). These models have greatly contributed to our understanding into mechanisms and molecular signals involved in hepatic regeneration, acute liver failure, hepatic function, metabolic response to injury. However, hepatic parenchyma proliferation following less severe injury has seldom been reported.

Here, we describe a model of liver proliferation in which an interface between the porous scaffold and the hepatic tissue was created providing the stimulus that induced the sequential migration and proliferation of liver parenchyma in mice. Remarkably, although there was no liver resection or extensive hepatocyte death, the liver parenchyma was able to colonize the synthetic matrix forming a liver-like structure. It is likely that the inflammatory reaction at the site of implantation and the production of cytokines may have contributed to the process of cell migration towards the scaffold. A number of pro-inflammatory and growth factors (TNF α , IL-6, hepatocyte growth factors and epidermal growth factors) is involved in controlling liver regeneration [17]. Previous studies from our group have shown that implantation of this biocompatible scaffold intraperitoneally induced the formation of a fibrovascular tissue

that contained parenchymal and non-parenchymal cells from the adjacent organs that had firmly adhered to it [14,18–20]. Interestingly, no exogenous growth factors or extracellular components were added to the scaffold. More importantly, apart from the surgical incision to the abdominal muscles and peritoneal structures, the placement of the scaffold under the liver left lobe did not require any further damage to the organ. These important features of our model of hepatic proliferation (no need of exogenous factors and minimally invasive) overcome the disadvantages of other models in which the scaffolds had to be loaded with single/multiple growth factors and extracellular matrix components [11,13]. Addition of exogenous growth factors to scaffolds is of limited value due to lack of information about dosage and type of factors to be loaded [13]. It is likely that some features (size of the pore, architecture) of our synthetic matrix provided a suitable microenvironment that allowed the colonization of the scaffold by the parenchymal and non-parenchymal liver cells. The average pore diameter of the polyether-polyurethane scaffold was 474 μm as previously reported [20]. It has been proposed that the pore size of a scaffold determines the success of the vascularization process post implantation, since diameters smaller than 400 μm limit the growth and diameter of blood vessels [21]. Furthermore, the potential for cells to migrate into the porous of a scaffold is influenced by the biophysical nature of that scaffold, for example, the biomaterial itself, its architecture, the ligand capacity [22,23].

No relevant liver dysfunction was observed during most of the experimental period after the placement of the polyether-polyurethane scaffold on the liver, as only at day 4 post implantation serum ALT increased but decreased to control levels at day 8 onwards.

Histological analysis of the implants showed that the pattern of hepatic proliferation observed resembled that of normal liver proliferation. Cell migration

(hepatocytes, endothelial cells, stellate cells) was followed by subsequent sinusoid capillaries generation and by the presence of bile ducts. This sequential liver development is consistent with that observed after hepatic lesion and/or stimuli as described by Wack *et al* 2001 and Ross *et al* 2001 [24,25]. The proliferation of hepatocytes within the synthetic scaffold was confirmed using mouse monoclonal antibody anti CDC-47. This marker of cellular proliferation was higher in 8 and 12-day old implants compared with that in 25 day-old implants. Cellular proliferation in control liver tissue (non-bearing implant) was similar to that found in 25-day old implants. Our findings are in agreement with the work by Ramalho *et al* 1993 who claimed that the regenerative process in the liver keeps on from 7 to 14 days [26].

The newly tissue that infiltrated the scaffold was initially (day 4) composed of an extracellular matrix, dense inflammatory infiltrate, blood vessels of various sizes, and spindle-shaped fibroblasts. After day 8, parenchymal and non-parenchymal liver tissue including the various vascular components (central veins, portal space and sinusoids capillaries) were identified. Induction of a capillary network into scaffold, is a requirement and advantage of any construct involving biomaterials [27].

Collagen deposition in the liver tissue has to be adequate not to generate a fibrotic response, the most fearful result of liver chronic diseases, resulting in loss of microvilli, reduction in the number and size of fenestration of hepatocytes and lower accessibility of the same protein [28–30]. We evaluated collagen deposition in the tissue that infiltrated the implant and found no significant difference between the amount of collagen in the newly formed liver at the various time points (8, 12 and 25 days) and the control liver. Thus, it seems that a healthy hepatic parenchyma was induced in the scaffold that could be further explored to restore normal parenchyma in fibrotic liver diseases.

The levels of relevant inflammatory and fibrogenic cytokines, TNF- α and TGF- β 1, respectively, were examined in the scaffold. The production of TNF- α exhibited a biphasic profile, that is, there was a peak at day 8 followed by a decrease at day 25. This indicates that this cytokine modulated the process of liver proliferation in a controlled pattern which is consistent with the well-established role of TNF- α in other liver regeneration models [31,32]. TGF- β is one of the most important cytokines driving liver fibrosis. It is also one of the most potent inhibitors of hepatocyte proliferation. Our findings showed that the levels of TGF- β in the scaffolds were similar at all time points examined. It is possible that the steady production of this cytokine was involved in the proliferative activity of both parenchymal and non-parenchymal cell and in controlling extracellular matrix deposition in the scaffold [33].

Various types of synthetic scaffolds loaded with growth factors and/or extracellular components have proved useful implantable devices to induce liver proliferation [22,34,35]. However, using our polymeric biohybrid system we were able to show the development of parenchymal and non-parenchymal liver components without the need of exogenous growth factors. Furthermore, no surgical incision to the liver was necessary for the placement of the scaffold under the liver left lobe. This model holds potential to investigate physiological mechanisms of liver proliferation, rather than regeneration and/or remodeling, since it occurred in absence of hepatic resection or toxicity.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Funding

This study was funded by FAPEMIG (APQ 01461-12) and CNPq (481659/2012-9).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure legends

Fig. 1 Synthetic matrix implantation. A) Representative photograph of the implantation technique in the mouse and the disc of the synthetic matrix in detail; B) Gross appearance of the scaffold after implantation (4, 8, 12 and 25 days). C) Microscopic appearance of control liver and progressive infiltration of the scaffold by liver tissue at days 4, 8, 12 and 25 (lupa magnification - Bar 0.5cm – Hematoxylin-Eosin)

Fig. 2 Representative histological sections of scaffolds (synthetic matrix of polyether-polyurethane) removed at fixed time intervals (4, 8, 12 and 25 days). – Progressive infiltration of hepatic tissue in the scaffold is seen. B) I- hepatocyte cluster inside the scaffold; II- individual hepatocyte (arrow) close to the sponge matrix*; III- biliary ducts (arrowhead); IV- central vein (black circle) V- portal space (cross) C) Area of hepatic parenchyma intra-implant. D) Wet weight values of the scaffolds. Values shown are expressed as mean \pm SEM. *Significant difference between the groups (ANOVA) $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; Bar 100 μm .

Fig. 3 Cell proliferation marker in scaffold sections at days 8 (A), 12 (B) and 25 (C). Hepatocytes, spindle-shaped fibroblast-like cells, endothelial cells and stellate cells were positive to cell proliferation marker CDC47 by immunohistochemistry staining. D) High magnification of endothelial cell*. E) High magnification of hepatocyte (black arrow) and stellate cell (arrowhead). F) High magnification of spindle-shaped fibroblast-like cells (white arrows). G) Morphometric analysis of percentage of CDC47-positive cells showing higher number of CDC47-positive hepatocytes at day 8, compared with days 12 and 25. Data represent mean \pm SEM for each interval *Significant difference between the groups (ANOVA) * $P < 0.05$. (A-C: Bar = 50 μm ; D-E: Bar = 20 μm).

Fig.4 Analysis of collagen area in the scaffold. A-B) Representative histological section (Picrosirius staining) of collagen deposition in hepatic parenchyma; C) Morphometric analysis of the collagen deposition. Data represent mean \pm SEM for each interval *Significant difference between the groups (ANOVA) * $P < 0.05$. Bar 100 μm

Fig. 5 Vascular components of the newly formed liver. A) Representative histological sections (HE) of central veins in hepatic tissue in control liver (CT) and in hepatic tissue intra-implant (8, 12 and 25 days after implantation). B) Morphometric analysis of the central vein number. Data represent mean \pm SEM for each interval. *Significant difference between the groups (ANOVA) * $P < 0.05$. Barr 50 μm

Fig. 6 Assessment of hepatic function. A) Serum total protein concentration (g/dL); B) Serum albumin concentration (g/dL); C) Serum Alanine Aminotransferase (ALT/SGPT) (UI); D) Serum Aspartate Aminotransferase (AST/SGOT) (UI). The levels of serum total protein, albumin and AST were similar in the between control animals (non-bearing scaffold and bearing-scaffold in the 4 time points examined. The serum ALT increased at day 4 but returned to basal level at day 25. Data represent mean \pm SEM for each interval. *Significant difference between the groups (ANOVA) * $P < 0.05$

Fig. 7 Time course production of TNF- α and TGF- β 1 in the scaffold. The levels of TNF- α exhibited a biphasic pattern whereas the levels of TGF- β 1 were similar at all time points evaluated. Data represent mean \pm SEM for each interval. *Significant difference between the groups (ANOVA) * $P < 0.05$

References

- [1] G.K. Michalopoulos, M.C. DeFrances, Liver regeneration., *Science*. 276 (1997) 60–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082986>.
- [2] H.M. Rabes, Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver., *Ciba Found. Symp.* (1977) 31–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/248005>.
- [3] G.D. Block, Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium, *J. Cell Biol.* 132 (1996) 1133–1149. doi:10.1083/jcb.132.6.1133.
- [4] D.B. Stolz, W.M. Mars, B.E. Petersen, T.H. Kim, G.K. Michalopoulos, Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat., *Cancer Res.* 59 (1999) 3954–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10463591>.
- [5] M. Jo, D.B. Stolz, J.E. Esplen, K. Dorko, G.K. Michalopoulos, S.C. Strom, Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8806–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722725>.
- [6] G.K. Michalopoulos, Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis, in: *Compr. Physiol.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013. doi:10.1002/cphy.c120014.
- [7] G. Higgins, R. Anderson, Experimental pathology of the liver – Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal, *Arch Pathol.* 12 (1931) 186–202.
- [8] J. HARDIN, B. L., Carbon Tetrachloride Poisoning-a Review., *Ind. Med. Surg.*

(1954) 93–105.

- [9] D.J. Miller, R. Hickman, R. Fratter, J. Terblanche, S.J. Saunders, An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study., *Gastroenterology*. 71 (1976) 109–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1278635>.
- [10] W. Wei, O. Dirsch, A. Lawson Mclean, S. Zafarnia, M. Schwier, U. Dahmen, Rodent Models and Imaging Techniques to Study Liver Regeneration, *Eur. Surg. Res.* 54 (2015) 97–113. doi:10.1159/000368573.
- [11] Y. Takimoto, V. Dixit, M. Arthur, G. Gitnick, De Novo Liver Tissue Formation in Rats Using a Novel Collagen-Polypropylene Scaffold, *Cell Transplant.* 12 (2003) 413–421. doi:10.3727/000000003108746966.
- [12] A. Kedem, A. Perets, I. Gamlieli-Bonshtein, M. Dvir-Ginzberg, S. Mizrahi, S. Cohen, Vascular Endothelial Growth Factor-Releasing Scaffolds Enhance Vascularization and Engraftment of Hepatocytes Transplanted on Liver Lobes, *Tissue Eng.* 11 (2005) 715–722. doi:10.1089/ten.2005.11.715.
- [13] J.S. Hammond, T.W. Gilbert, D. Howard, A. Zaitoun, G. Michalopoulos, K.M. Shakesheff, et al., Scaffolds containing growth factors and extracellular matrix induce hepatocyte proliferation and cell migration in normal and regenerating rat liver, *J. Hepatol.* 54 (2011) 279–287. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.040.
- [14] J.B. Mendes, P.P. Campos, M.A.N.D. Ferreira, Y.S. Bakhle, S.P. Andrade, Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 83B (2007) 408–415. doi:10.1002/jbm.b.30810.
- [15] P.R. Castro, S.M. Marques, P.P. Campos, C.C. Cardoso, F.P. Sampaio, M.A.N.D. Ferreira, et al., Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice, *Microvasc. Res.* 84 (2012) 9–15.

doi:10.1016/j.mvr.2012.04.003.

- [16] S.P. Andrade, T.P. Fan, G.P. Lewis, Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model., *Br. J. Exp. Pathol.* 68 (1987) 755–66.
[/pmc/articles/PMC2013085/?report=abstract.](#)
- [17] G.K. Michalopoulos, Liver regeneration, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 286–300.
doi:10.1002/jcp.21172.
- [18] J.B. Mendes, M.A. Rocha, F.A. Araújo, S.A.L. Moura, M.A.N.D. Ferreira, S.P. Andrade, Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice, *Microvasc. Res.* 78 (2009) 265–271. doi:10.1016/j.mvr.2009.08.008.
- [19] F.A. Araújo, M.A. Rocha, M.A. Ferreira, P.P. Campos, L.S. Capettini, V.S. Lemos, et al., Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38 (2011) 262–268.
doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05496.x.
- [20] L.X. Pereira, C.T.R. Viana, L.A.A. Orellano, S.A. Almeida, A.C. Vasconcelos, A. de M. Goes, et al., Synthetic matrix of polyether-polyurethane as a biological platform for pancreatic regeneration, *Life Sci.* 176 (2017) 67–74.
doi:10.1016/j.lfs.2017.03.015.
- [21] B. Feng, Z. Jinkang, W. Zhen, L. Jianxi, C. Jiang, L. Jian, et al., The effect of pore size on tissue ingrowth and neovascularization in porous bioceramics of controlled architecture *in vivo*, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 15007.
doi:10.1088/1748-6041/6/1/015007.
- [22] J.S. Hammond, T.W. Gilbert, D. Howard, A. Zaitoun, G. Michalopoulos, K.M. Shakesheff, et al., Scaffolds containing growth factors and extracellular matrix induce hepatocyte proliferation and cell migration in normal and regenerating rat

- liver, *J. Hepatol.* 54 (2011) 279–287. doi:10.1016/j.jhep.2010.06.040.
- [23] K.S. Vasanthan, A. Subramanian, U.M. Krishnan, S. Sethuraman, Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 742–752. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.004.
- [24] K.E. Wack, M.A. Ross, V. Zegarra, L.R. Sysko, S.C. Watkins, D.B. Stolz, Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver, *Hepatology.* 33 (2001) 363–378. doi:10.1053/jhep.2001.21998.
- [25] M.A. Ross, C.M. Sander, T.B. Kleeb, S.C. Watkins, D.B. Stolz, Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver, *Hepatology.* 34 (2001) 1135–1148. doi:10.1053/jhep.2001.29624.
- [26] F.S. Ramalho, L.N.Z. Ramalho, S. Zucoloto, O.C. Silva Júnior, Liver regeneration: some definitions in an universe of doubts, *Acta Cir. Bras.* 8(4) (1993) 177–89.
- [27] A. Nishiguchi, M. Matsusaki, Y. Asano, H. Shimoda, M. Akashi, Effects of angiogenic factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich cultures, *Biomaterials.* 35 (2014) 4739–4748. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.079.
- [28] M. Rojkind, M.A. Giambone, L. Biempica, Collagen types in normal and cirrhotic liver., *Gastroenterology.* 76 (1979) 710–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/421999>.
- [29] E. Hahn, G. Wick, D. Pencev, R. Timpl, Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin, *Gut.* 21 (1980) 63–71. doi:10.1136/gut.21.1.63.
- [30] S.L. Friedman, The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis -- Mechanisms and

Treatment Strategies, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 1828–1835.

doi:10.1056/NEJM199306243282508.

- [31] F.F. Mohammed, D.S. Smookler, S.E.M. Taylor, B. Fingleton, Z. Kassiri, O.H. Sanchez, et al., Abnormal TNF activity in *Timp3*^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration., *Nat. Genet.* 36 (2004) 969–977. doi:10.1038/ng1413.
- [32] R.S. McMahan, K.J. Riehle, N. Fausto, J.S. Campbell, A disintegrin and metalloproteinase 17 regulates TNF and TNFR1 levels in inflammation and liver regeneration in mice, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 305 (2013) G25–G34. doi:10.1152/ajpgi.00326.2012.
- [33] A. Rókus, D. Veres, A. Szűcs, E. Bugyik, M. Mózes, S. Paku, et al., Ductular reaction correlates with fibrogenesis but does not contribute to liver regeneration in experimental fibrosis models, *PLoS One.* 12 (2017) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0176518.
- [34] M. Kim, J.Y. Lee, C.N. Jones, A. Revzin, G. Tae, Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes, *Biomaterials.* 31 (2010) 3596–3603. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.068.
- [35] Q. Hou, P.A. De Banka, K.M. Shakesheff, Injectable scaffolds for tissue regeneration, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 1915–1923.

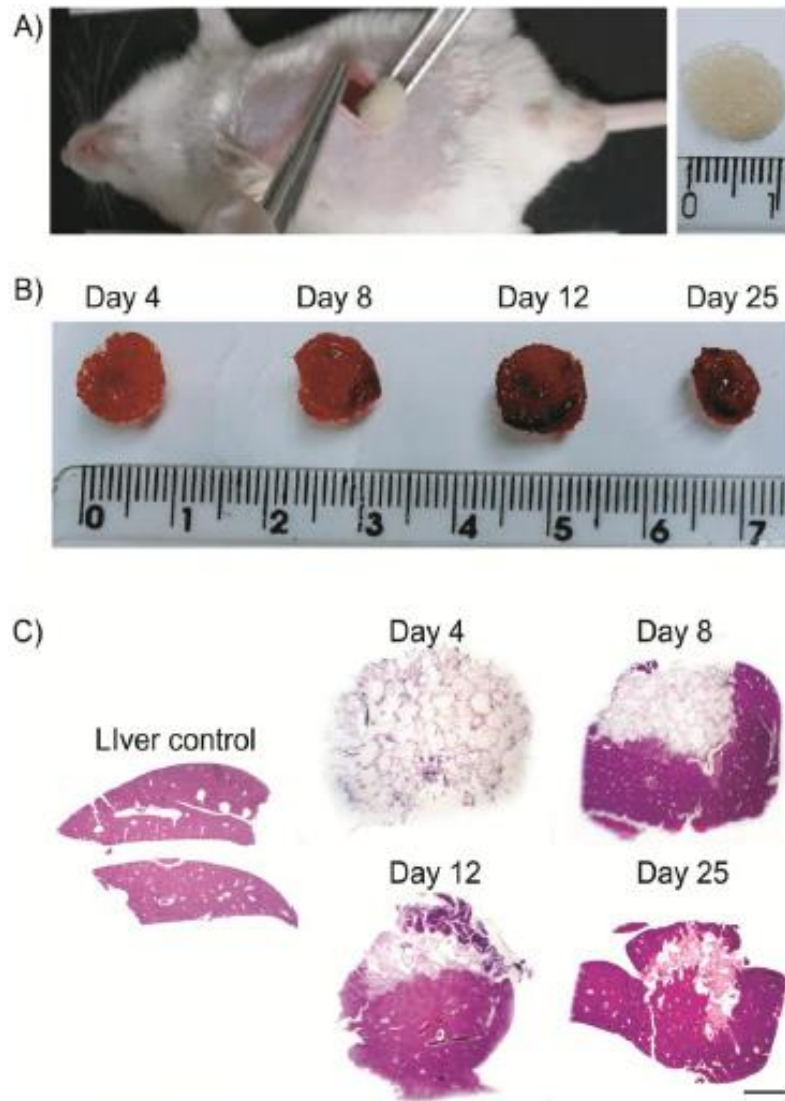


Fig. 1

ACCE

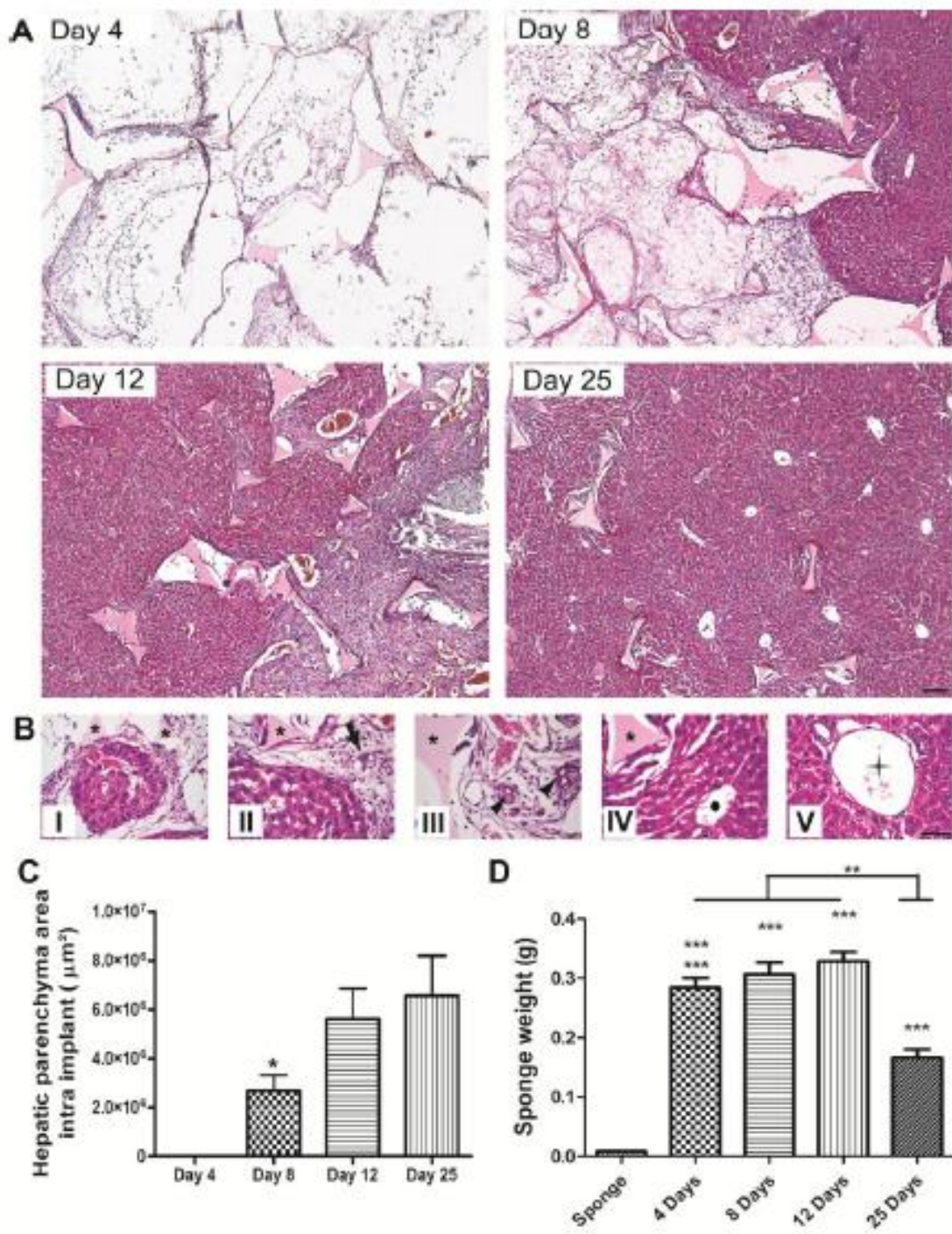


Fig. 2

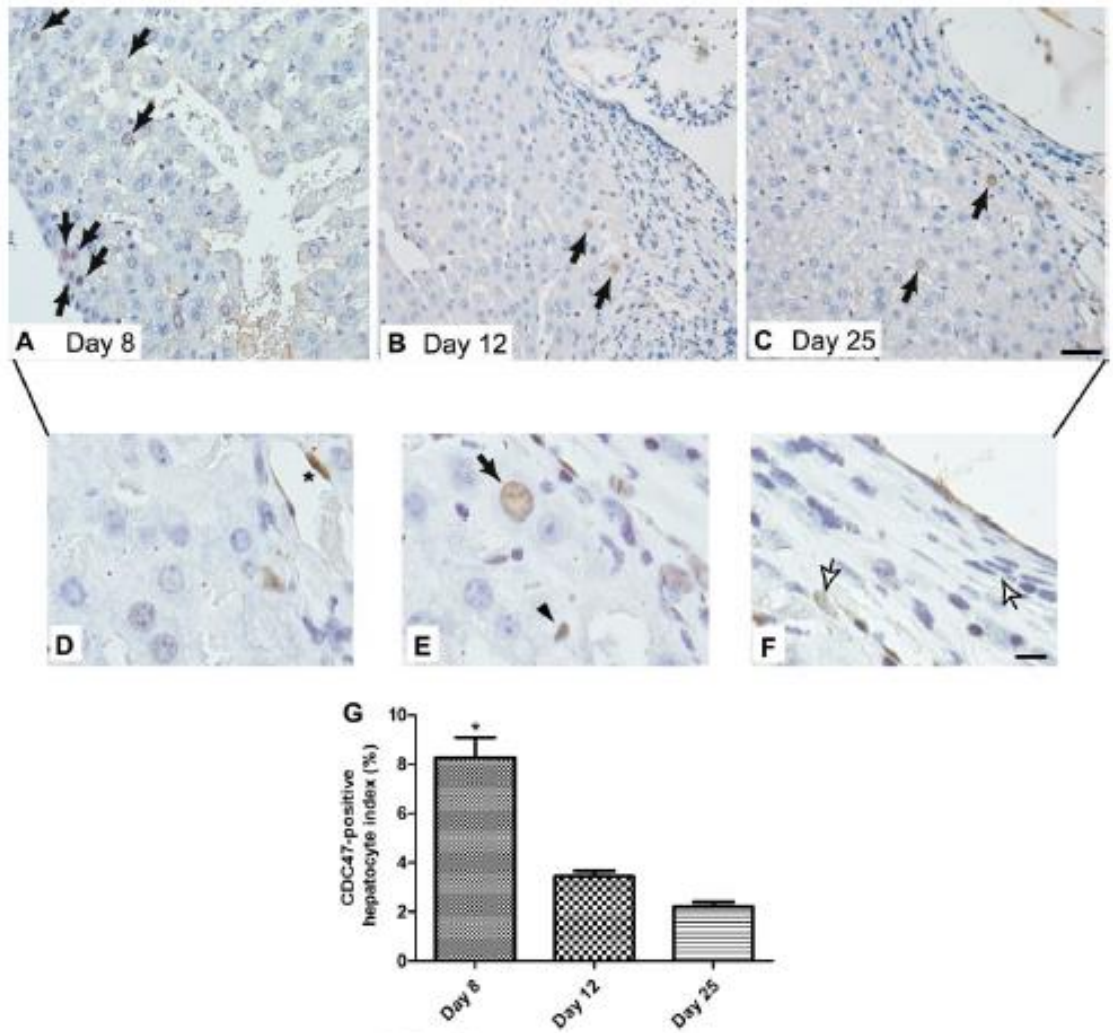


Fig. 3

ACCEPTED

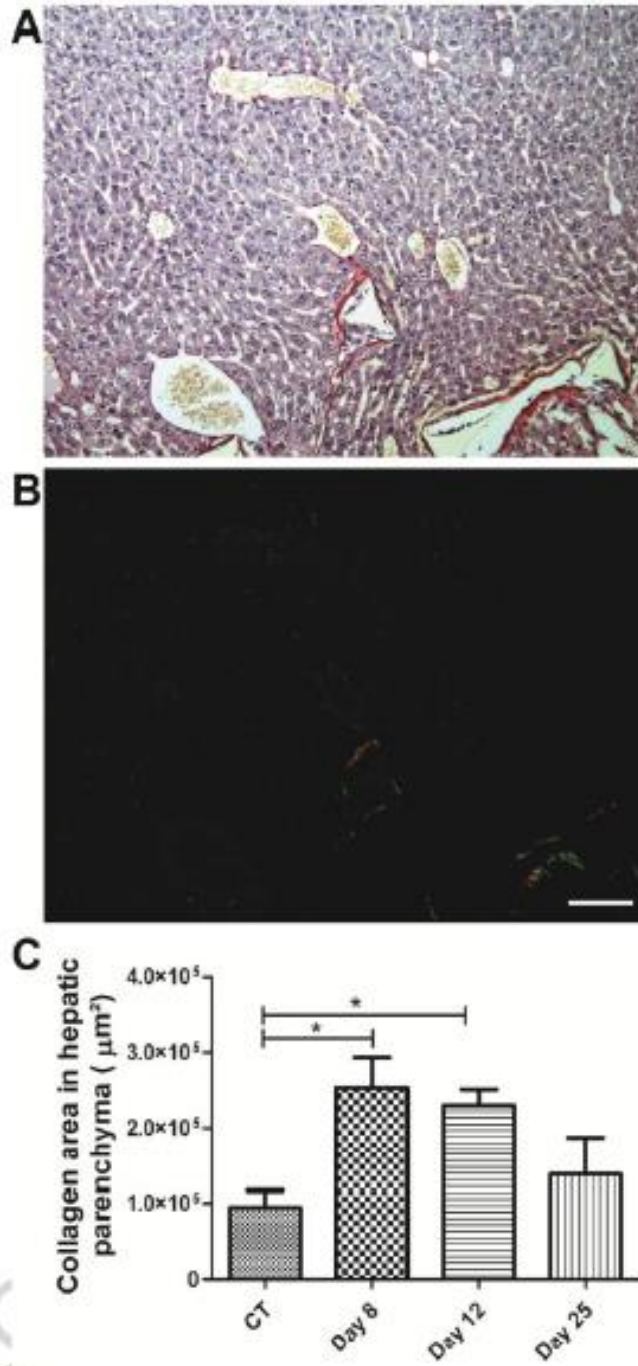


Fig. 4

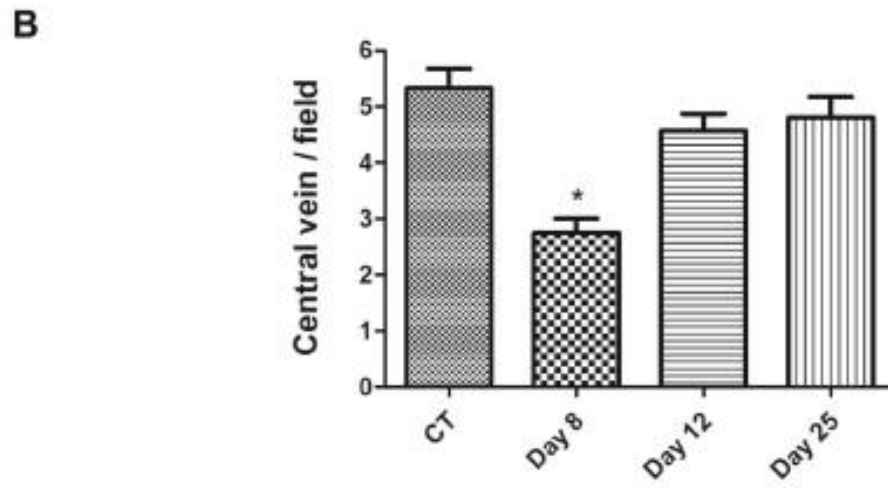
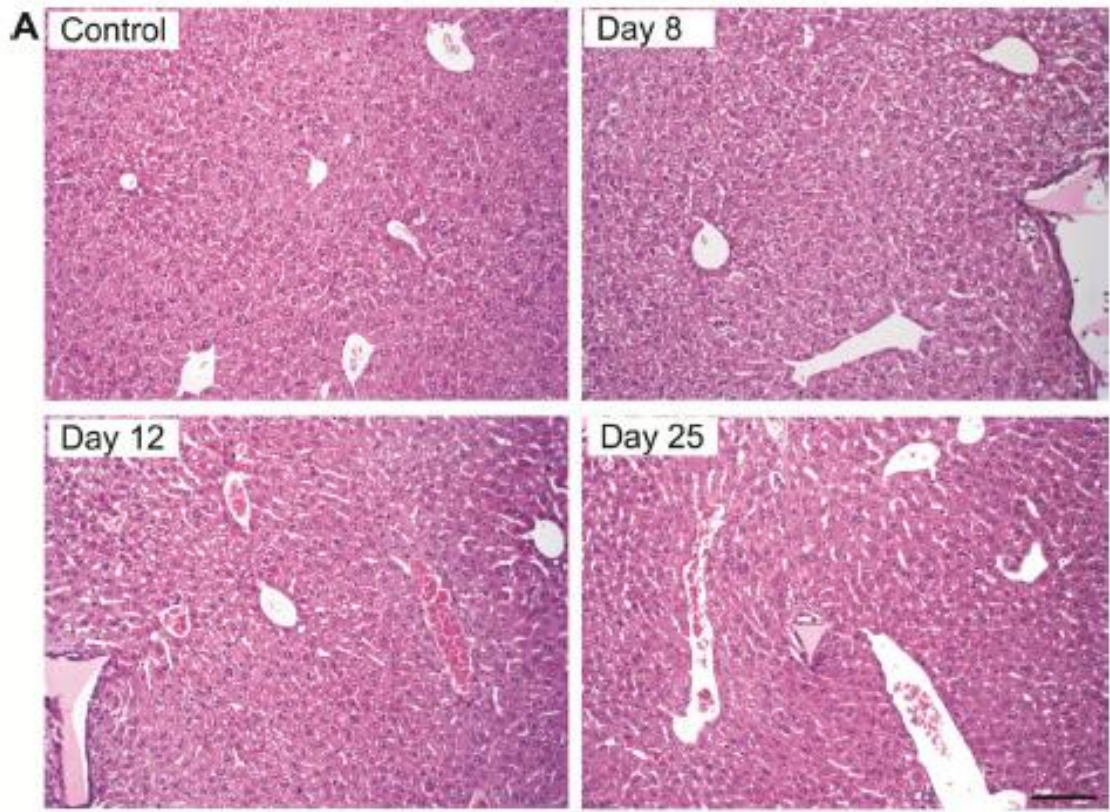


Fig. 5

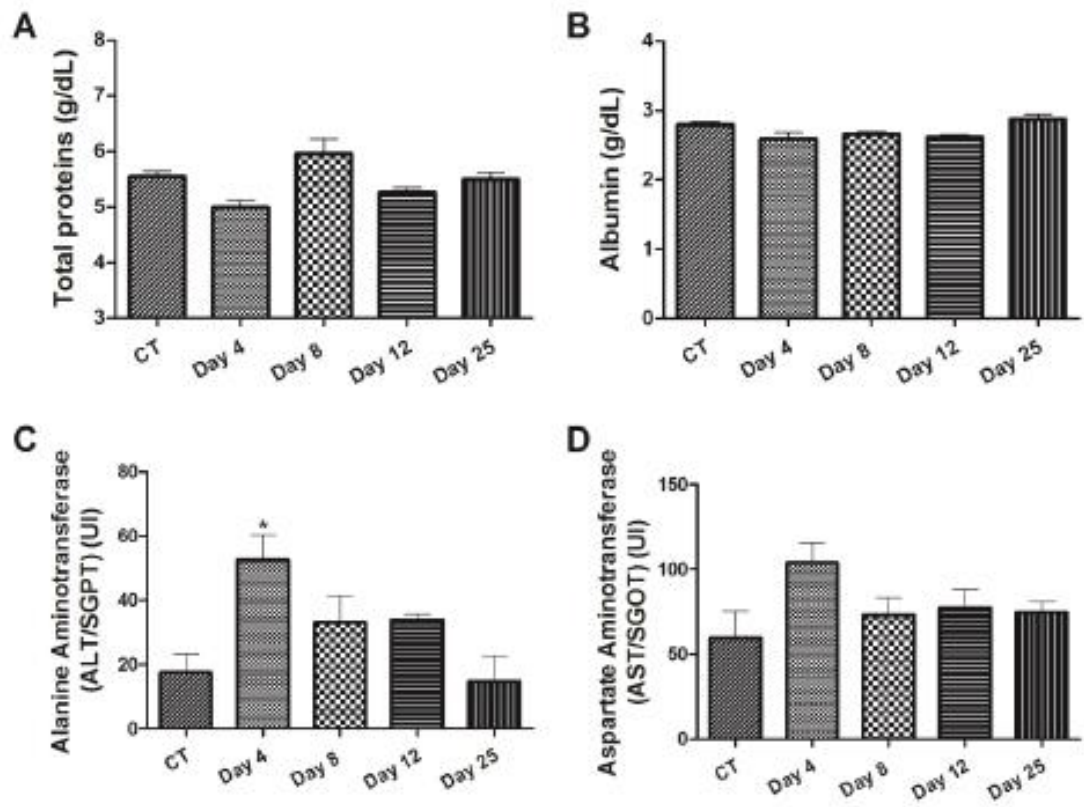


Fig. 6

ACCEPTED MANUSCRIPT

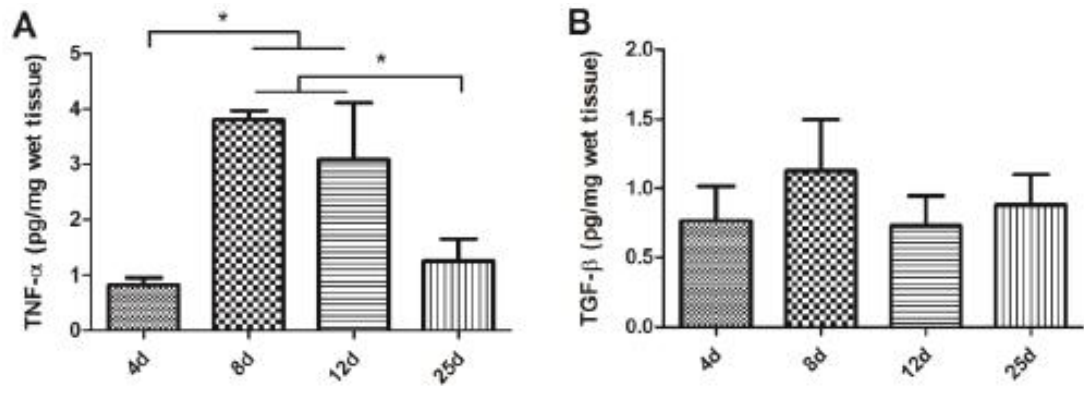
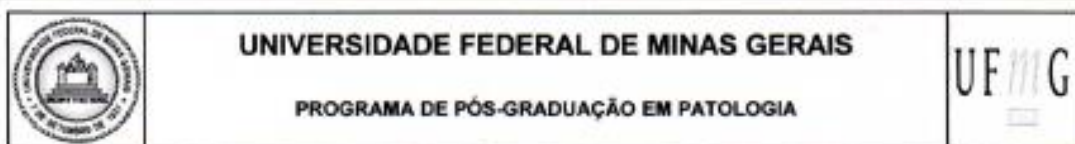


Fig. 7

ACCEPTED MANUSCRIPT

9.3 ANEXO C – Ata da defesa da dissertação de mestrado



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA **MARCELA GUIMARÃES TAKAHASHI DE LAZARI**

Realizou-se, no dia 14 de dezembro de 2017, às 09:00 horas, C3 241, ICB, UFMG Campus Pampulha, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Indução de proliferação hepática utilizando uma plataforma polimérica em camundongos*, apresentada por MARCELA GUIMARÃES TAKAHASHI DE LAZARI, número de registro 2016662829, graduada no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Paula Peixoto Campos Lopes Orientadora (UFMG) , Prof. André Gustavo de Oliveira (UFMG), Prof(a). Cristiano Xavier Lima (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2017.



Profª Paula Peixoto Campos Lopes - Orientadora

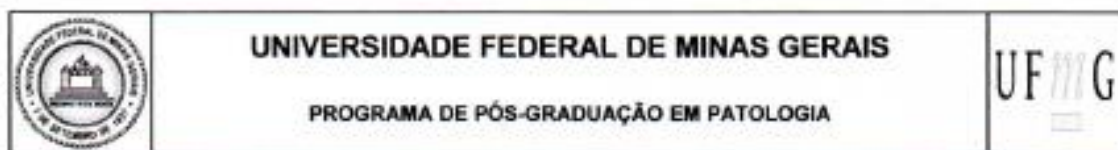


Prof. Andre Gustavo de Oliveira (Doutor)



Prof. Cristiano Xavier Lima (Doutor)

9.4 ANEXO D – Folha de aprovação



FOLHA DE APROVAÇÃO

Indução de proliferação hepática utilizando uma plataforma polimérica em camundongos

MARCELA GUIMARÃES TAKAHASHI DE LAZARI

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 14 de dezembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Paula Peixoto Campos Lopes – Orientadora
UFMG


Prof. André Gustavo de Oliveira
UFMG


Prof. Cristiano Xavier Lima
UFMG

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2017.