

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**MODELO MURINO DE TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO
HEPATOCELULAR INDUZIDA PELA GRISEOFULVINA COM
INFUSÃO ENDOVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

ALESSANDRA RODRIGUES COELHO ZANELLA

VILA VELHA
SETEMBRO / 2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**MODELO MURINO DE TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO
HEPATOCELULAR INDUZIDA PELA GRISEOFULVINA COM
INFUSÃO ENDOVENOSA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada a Universidade Vila Velha, com pré-requisito do Programa de Mestrado em Ciência Animal, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ALESSANDRA RODRIGUES COELHO ZANELLA

VILA VELHA
SETEMBRO / 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

Z28m Zanella, Alessandra Rodrigues Coelho.

Modelo murino de tratamento da degeneração hepatocelular induzida pela griseofulvina com infusão endovenosa de células tronco mesenquimais / Alessandra Rodrigues Coelho Zanella. – 2013.

37 f.: il.

Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Medicamentos – uso terapêutico. 2. Terapêutica celular – animais domésticos. I. Monteiro, Betânia Souza. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

ALESSANDRA RODRIGUES COELHO ZANELLA

**MODELO MURINO DE TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO
HEPATOCELULAR INDUZIDA PELA GRISEOFULVINA COM
INFUSÃO ENDOVENOSA DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada a
Universidade Vila Velha, com pré-
requisito do Programa de Mestrado
em Ciência Animal, para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 23 de setembro de 2013,

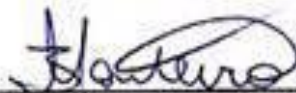
Banca Examinadora:



Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto (UFPI)



Dra. Tatiana Champion (UVV)



Dra. Betânia Souza Monteiro (UVV - Orientadora)

DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho a minha irmã, Danielle, pelo amor incondicional, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa que viabilizou meus estudos, dedicação e ao apoio financeiro ao projeto.

À Universidade de Vila Velha que proporcionou todo apoio na logística e execução do projeto de pesquisa.

À minha orientadora Betânia Souza Monteiro, por toda paciência e dedicação durante todo esse processo.

À todos os professores do programa de Mestrado em Ciência Animal, que contribuíram para a minha formação.

Ao colega Mário Sérgio Wanzeller, do Laboratório de Acompanhamento Experimental da UVV, pela ajuda e companhia agradável durante todo o meu projeto.

Às colegas Noely e Emanuelle que me ajudaram durante a realização do meu projeto. Sou muito grata!

À minha amiga Roberta, pelo companheirismo e paciência nos momentos compartilhados de alegrias, tristezas e dificuldades nesse longo percurso.

À minha família que sempre se fez presente mesmo estando longe, meus pais e minha irmã que são minha base, meu alicerce. Ao Ricardo, por todo amor, carinho e compreensão.

Ao colega Wagner Fiorio pelos ensinamentos de patologia neste projeto.

Ao colega e professor, Dominik Lenz por estar sempre disposto e pronto para ajudar.

E também não poderia deixar de agradecer aos animais que tornaram esse projeto possível, que Deus abençoe todas as criaturas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1- INTRODUÇÃO	01
2- REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1- O fígado como órgão e sua histologia	03
2.1 –Griseofulvina	07
2.3- Hepatite e lesão hepatocelular, aspectos morfológicos e etiopatogênicos	08
2.4 -Células-tronco mesenquimal na regeneração	10
3- OBJETIVOS	13
3.1- Objetivos gerais	13
3.2- Objetivos específicos	13
4- MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1- Protocolo de ética	14
4.2- Animais de experimentação	14
4.3- Isolamento, caracterização e expansão das CTM	15
4.4- Estudo <i>in vivo</i>	16
4.5- Estudo Histopatológico	19
4.6- Análise Estatística	20
5-RESULTADOS	21
5.1- Cultura celular	21
5.2- Alterações Clínicas	23
5.3- Alterações Histopatológicas	23
5.4- Alterações Estatísticas	28
6. DISCUSSÃO	29
7.CONCLUSÃO	33
8.REFERÊNCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representando um lóbulo hepático onde no aumento do espaço porta representado pela seta amarela é possível observar as estruturas demonstradas na foto	05
Figura 2: Imagem demonstrando um rato wistar contido manualmente recebendo o fármaco griseofulvina.	17
Figura 3: Animal do grupo GCTM, recebendo a infusão de células tronco mesenquimais pela veia lateral da cauda.	18
Figura 4: Organograma demonstrando os animais de experimentação e como eles foram alocados nas diferentes etapas do estudo.	19
Figura 5: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais	22
Figura 6: Aspecto histológico do fígado de ratos Wistar alocados no experimento.	25
Figura 7: Aspecto histológico do fígado de ratos Wistar alocados no experimento em maior aumento.	26
Figura 8: Gráfico demonstrando as lesões por mm ² no eixo x, nos dias 5, 10 e 15 dias pós-tratamento com CTM ou PBS no eixo y.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Apresenta quantidade de lesões por mm ² dos animais dos grupos do experimento nos dias 5, 10 e 15 dias pós- tratamento.	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CTM = Células Tronco Mesenquimais

MO = Medula Óssea

SID = Uma vez ao dia

PBS = Tampão de fosfato salina

PSA = Penicilina, estreptomicina, anfotericina B

pH = Potencial hidrogeniônico

DMEM = Dulbeccos's Modified Eagle Medium

SFB = Soro Fetal Bovino

°C = Graus Celsius

CO₂ = Dióxido de Carbono

GT = Grupo Testemunha

GCT = Grupo Células Tronco Mesenquimais

HE = Hematoxilina e Eosina

RESUMO

ZANELLA, Alessandra Rodrigues Coelho, MSc., Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2013. **Modelo murino de tratamento da degeneração hepatocelular induzida pela griseofulvina com infusão endovenosa de células tronco mesenquimais.** Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

A griseofulvina é um fármaco que ao ser utilizado por um longo período de tempo pode levar a alterações hepatocelulares em ratos. Buscando-se mitigar a lesão celular farmacológica, a terapia com células tronco mesenquimais (CTM) apresenta-se como alternativa terapêutica. Neste experimento foram utilizados 29 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, dos quais 2 destes animais foram utilizados para o estudo *in vitro* de onde foram coletadas e posteriormente cultivadas as CTM. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados os demais 27 animais, que possuíam 16 semanas de idade, pesando aproximadamente 300 gramas, que foram medicados com griseofulvina na dose de 250mg/kg SID, VO, durante 30 dias, após este período 3 animais foram eutanasiados para avaliação histopatológica da arquitetura hepática, os demais 24 animais foram divididos em dois grupos, os animais do grupo testemunha (GT) receberam por via parenteral pela veia lateral da cauda 0,5ml de tampão de fosfato salina (PBS) e grupo células tronco mesenquimais (GCTM) receberam a infusão de $1,2 \times 10^6$ de CTM (volume final de 0,5ml), em aplicação única, por via parenteral pela veia lateral da cauda. Após esta etapa os animais foram submetidos à eutanásia aos 5, 10 e 15 dias pós-tratamento com CTM ou PBS e foram coletadas amostras do fígado para posterior análise histopatológica. Verificou-se a presença de degeneração hidrópica e congestão nos animais de ambos os grupos, no entanto a resposta à regeneração hepática no grupo GCTM foi mais evidente aos 15 dias quando comparada com os demais dias do mesmo tratamento e do grupo GT aos 15 dias. Acredita-se que por meio do mecanismo parácrino e telócrino, as CTM auxiliaram de forma positiva na regeneração deste órgão. Pode-se concluir que a griseofulvina na dose utilizada causou alterações hepatocelulares e que o uso da infusão de CTM derivadas da medula óssea contribuiu de forma positiva para a regeneração hepática.

Palavras chave: Degeneração hidrópica, lesão hepática, terapia celular.

ABSTRACT

ZANELLA, Alessandra Rodrigues Coelho, MSc., Universidade Vila Velha – ES, september de 2013. **Murine model of hepatocellular degeneration induced with griseofulvin with treatment by intravenous infusion of mesenchymal stem cells.** Adviser: Betânia Souza Monteiro.

Griseofulvin is a drug that, when used for a long period of time, can lead to hepatocellular changes in rats. Seeking to mitigate the pharmacological cell injury, therapy with mesenchymal stem cells (MSC) is presented as an alternative therapy. In this experiment, 29 rats (*Rattus norvegicus albinos*) Wistar were used, of which 2 of these animals were used for the in vitro study where they were collected and subsequently cultured MSC's. For the in vivo study, the remaining 27 animals, which had 16 weeks of age, weighing approximately 300 grams, which were treated with griseofulvin at a dose of 250mg/kg SID, VO, 30 days, after this period 3 animals were euthanized and were used for histopathological evaluation of liver architecture, the remaining 24 animals were divided into two groups, animals in the control group (GT) were given parenterally by lateral tail vein of 0,5 ml of phosphate buffer saline (PBS) group and stem cells mesenchymal cells (GCTM) received an infusion of $1,2 \times 10^6$ MSC (final volume 0,5 ml) in a single application, parenterally by lateral tail vein. After this stage the animals were euthanized at 5, 10 and 15 days post-treatment with MSC or PBS and liver samples were collected for subsequent histological analysis. We verified the presence of congestion and hydropic degeneration in animals of both groups, but the response to liver regeneration in GCTM group was more evident at 15 days when compared with the other treatment at the same day and the GT at 15 days. It is believed that through telecrine and paracrine mechanism, the MSC positively assisted regeneration of the organ. It can be concluded that the dose used in griseofulvin caused hepatocellular changes, and that the use of infusion of bone marrow-derived MSCs contributed positively to liver regeneration.

Key words: Hydropic degeneration, liver damage, cell therapy.

1-INTRODUÇÃO

Muitos medicamentos têm o potencial de causar lesão hepática em animais de pequeno e grande porte. Dentre os fármacos que causam este tipo de lesão está descrita a griseofulvina (CAMPOS et al., 2009).

A griseofulvina tem sido utilizada por mais de 30 anos como fármaco em humanos para tratamento de várias enfermidades como as dermatomicoses. Estudos em animais demonstram que ela pode causar uma variedade de efeitos tóxicos agudos e crônicos (KNASMÜLLER et al., 1997).

A griseofulvina é um agente fungistático, produzido pelo *Penicillium griseofulvin dierckx*. (WEBSTER, 2005). A griseofulvina é metabolizada primeiramente pelo fígado, e nos animais é metabolizada de forma mais rápida quando comparado à seres humanos, sendo este, o motivo para que sua dose em animais seja mais elevadas que as doses humanas (PAPAPIH et al., 2005; PAPAPIH, 2009).

O fígado, portanto, é particularmente suscetível à lesão tóxica, pois este é o primeiro órgão de recepção das toxinas absorvidas pelo trato gastrointestinal, e as enzimas hepáticas frequentemente convertem prototoxinas em metabólitos mais tóxicos (CAMPOS et al., 2009).

A griseofulvina, ao ser utilizada por um período longo, pode ocorrer a presença de alguns efeitos colaterais cutâneos, gastrointestinais, sangüíneos, neurológicos e hepáticos (BALDAL et al., 2007).

Na tentativa de mitigar a lesão celular farmacológica, a terapia com células tronco mesenquimais (CTM) apresenta-se como alternativa terapêutica (CAMPOS et al., 2009).

As células tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes e são capazes de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo (NAUTA e FIBBE, 2007).

Atualmente sabe-se que as CTM podem ser aplicadas diretamente no local da lesão (intra-lesional) isoladas, combinadas com biomateriais ou serem administradas por infusão intravenosa, pois são atraídas por quimiotaxia para os locais de lesão (MONTEIRO et al, 2012).

Devido ao fato do tratamento com drogas antifúngicas serem de longa duração e causarem hepatotoxicidade em alguns dos animais na clínica de pequenos animais, espera-se que as células tronco mesenquimais possam regenerar o tecido hepático desses animais.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - O fígado como órgão e sua histologia

O fígado é a maior glândula presente no corpo dos animais, corresponde a 2 – 5 % do peso corporal do organismo (BANKS, 1991). O fígado tem diversas funções fisiológicas tais como a síntese, excreção de bile, armazenamento, biotransformação e metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos, todas estas funções diretamente relacionadas ao hepatócitos. As duas principais células presentes neste órgão são representadas pelos hepatócitos e a células de Von Kupffer (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; BETTIO, 2010). A bile desempenha um importante fator na digestão de lipídeos. As células de Von Kupffer, são um membro do sistema macrófágico, que reveste regiões dos sinusóides hepáticos, portanto a atividade fagocitário do fígado é explicada pela função destas células. O órgão é dividido em setores e segmentos com independente suprimento sanguíneo e biliar aferente e eferente sem circulação colateral entre os segmentos (BANKS,1991; ALOIA,2006).

O fígado tem seu parênquima constituído principalmente por hepatócitos, que perfazem cerca de 80% da população celular e são os responsáveis por desempenhar a maior parte das funções deste órgão (GARTNER, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os hepatócitos são células poliédricas com 6 ou mais faces medindo 20 a 30 µm de diâmetro, possuem núcleo central, arredondado, com um ou dois nucléolos evidentes. (BANKS,1991; SAMUELSON, 2007). A aparência histológica destas células depende do estado fisiológico do organismo no

momento da coleta da amostra (BANKS,1991). Em indivíduos bem nutridos, há áreas de ergastoplasma que apresentam basofilia devida ao ácido nuclear ribonucléico (RNA) e espaços irregulares e arredondados no citoplasma criados pela perda de glicogênio e lipídeos, durante a preparação histológica, já em jejum os hepatócitos apresentam-se pequenos, turvos e mal delineados (BANKS, 1991 e FAUSTO et al., 2006).

Os hepatócitos são metabolicamente ativos e possuem muitas mitocôndrias, ribossomos, retículos endoplasmáticos rugosos e aparelho de Golgi, este último, encontra-se frequentemente próximo aos canalículos biliares (SAMUELSON, 2007).

Os hepatócitos se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas denominadas lóbulos hepáticos, que são massas prismáticas e poligonais de tecido formadas por placas ou lâminas de hepatócitos de cerca de 0,7 por 2 μm de tamanho (BANKS, 1991 e AGUIAR et al., 2011). As regiões nos cantos dos poliedros são denominadas espaço porta, que é o local onde se encontram 1 vênula, 1 arteríola, 1 ducto biliar e vasos linfáticos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; AGUIAR et al., 2011).

Os hepatócitos estão ligados de tal forma que constituem placas achatadas de células separadas por um espaço denominado sinusóide hepático, que são capilares que conectam os vasos interlobulares, a artéria hepática (arteríola) e a veia porta (vênula) com a veia central. Estes capilares hepáticos são revestidos por dois tipos de células: células endoteliais típicas de capilares sanguíneos e macrófagos que no fígado são denominados células de Von Kupffer. Estes macrófagos são células em formato de estrela, possui núcleo oval e grande com nucléolo evidente. Por pertencerem ao Sistema Mononuclear Fagocitário, possuem intensa atividade fagocitária, digerindo hemácias em via de degradação com a consequente digestão

de hemoglobina e produção de bilirrubina (BANKS, 1991; SAMUELSON, 2007; AGUIAR et al., 2011).

O capilar sinusóide apresenta-se envolto por um delicado arcabouço de fibras reticulares. No estreito espaço que separa a parede dos capilares sinusóides aos hepatócitos encontra-se o espaço de Disse, que contém células armazenadoras de lipídeos, com forma estrelada também conhecida como células de Ito (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004; SAMUELSON, 2007; AGUIAR et al., 2011). As células de Ito em resposta a lesão hepática, tornam-se contrateis e produzem fibras colágenas, desempenhando portanto, um importante papel na extensa fibrose com progressiva ruptura do parênquima que pode ocorrer em pacientes com cirrose hepática (ALOIA,2006).

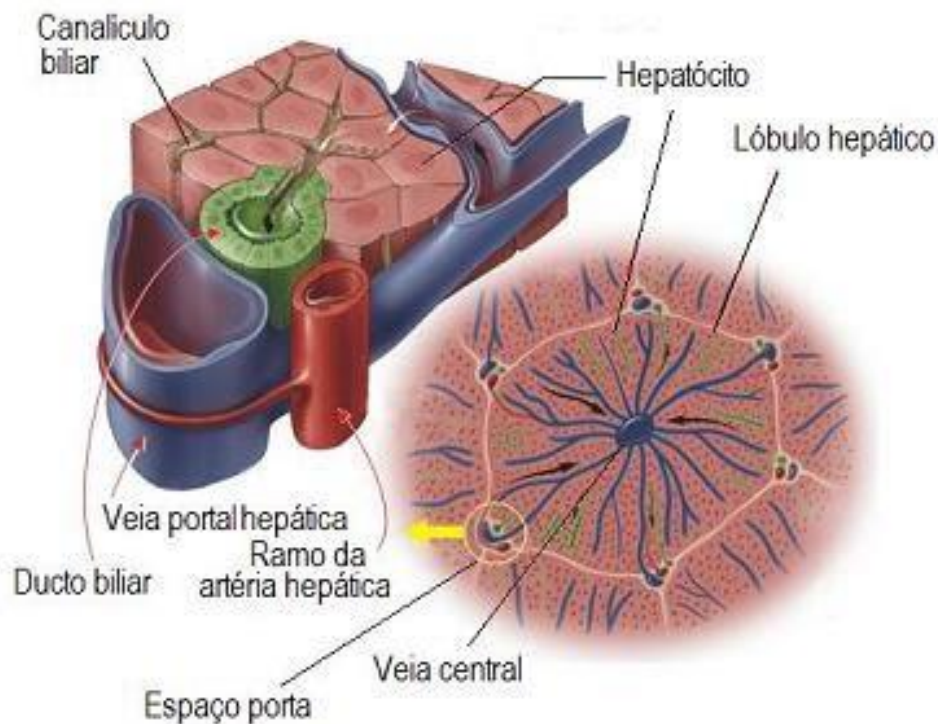


Figura 1: Imagem representando um lóbulo hepático onde no aumento do espaço porta representado pela seta amarela é possível observar as estruturas anatômicas hepáticas. Fonte: www.interdisciplinarbq.com.br (Acesso em Agosto de 2013).

Os espaços de Disse conectam-se com os vasos linfáticos nos septos interlobulares, logo, o excesso de líquido desses espaços é removido pelos vasos linfáticos. Nos sinusóides desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os capilares sinusóides desembocam na veia centrolobular, no centro do lóbulo. O fígado recebe 70% do sangue pela veia porta, e uma porção menor pelas artérias hepáticas. Pela veia porta chega ao fígado todo o material absorvido pelo intestino, com exceção dos lipídeos que são transportados por via linfática (BANKS,1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, 2007).

Os sinusóides hepáticos medem entre 10 e 30 μm de diâmetro. Seu endotélio é fenestrado e se assenta sobre uma membrana basal descontínua. Além disso, a junção entre as células endoteliais contíguas é incompleta e há separações de 0,1 a 0,5 μm . Os sinusóides hepáticos se diferenciam dos outros sinusóides do organismo porque entre suas células endoteliais estão intercalados por células de Von Kupffer (ALLOIA, 2006).

A bile é secretada pelos hepatócitos que circula pelos canalículos biliares até a periferia do lóbulo hepático, para ser posteriormente liberada dentro dos ductos biliares interlobulares. Os ductos biliares interlobulares, conduzem a bile para os ductos intra-hepáticos que se consolidam em ductos hepáticos. Os ductos hepáticos saem do fígado através de seus lobos e na maioria dos animais estão conectados ao ducto cístico que drena a bile para a vesícula biliar para que ela seja depois esvaziada no duodeno (SAMUELSON, 2007).

2.2 – Griseofulvina

A griseofulvina é um antibiótico fungistático produzido pelo *Penicillium griseofulvin dierkx*. Ela é ativa contra os dermatófitos *Microsporum sp.*, *Trichophyton sp.* e *Epidermophyton sp.*. É incolor, ligeiramente amargo e virtualmente insolúvel em água. A griseofulvina é metabolizada primeiramente pelo fígado, nos animais, ela é metabolizada cerca de 6x mais rápida que em humanos. Quando administrada a cada 24 horas por cerca de 6 semanas pode eventualmente causar efeitos colaterais cutâneos, gastrointestinais, sanguíneos, hepáticos e neurológicos (BALDAL et al.,2007).

A absorção oral deste fármaco é variável e depende do tamanho da partícula. Preparações de micropartículas são absorvidas de 25-70%, ao passo que as formulações com partículas menores (ultramicropartícula) são virtualmente 100% absorvidas. Na Medicina Veterinária a ultramicropartícula não é comumente utilizada devido ao seu alto custo (PAPAPIH et al.,2005).

Efeitos adversos são mais comuns em gatos que podem incluir anorexia, leucopenia, anemia, atividade enzimática hepática aumentada e neurotoxicose, já foi relatada ataxia em um felino jovem e hipoplasia medular em um gato adulto. A griseofulvina também pode ser muito teratogênica nesta espécie (PAPAPIH et al., 2005; WEBSTER, 2005).

A griseofulvina quando utilizada em tratamento para dermatopatias fungicas em homens e animais, e administradas em grandes quantidades causam lesões na arquitetura do fígado de ratos (DeMATTEIS et al., 1966).

2.3 – Hepatite e lesão hepatocelular, aspectos morfológicos e etiopatogênicos

O conceito regeneração é largamente utilizado na literatura, no entanto, a regeneração hepática é um processo de hiperplasia compensatória a qual é dirigida mais por necessidade funcional do que anatômica (AGUIAR et al., 2011). O fígado adulto normal é quiescente e apenas uma pequena porcentagem das suas células é submetida à divisão celular em qualquer tempo, mas pode rapidamente iniciar a proliferação celular em resposta à um estímulo. O processo de regeneração desse órgão aparece como resposta às agressões causadas ao fígado por ressecções cirúrgicas, traumas, infecções ou intoxicações medicamentosas, que tem como consequência perda do parênquima (FAUSTO et al., 2006).

Este processo vem sendo muito estudado, após a administração de tetracloreto de carbono ou após hepatectomia parcial em animais experimentais, ou em humanos após ressecção parcial do fígado ou necrose hepática maciça. No entanto, observou que qualquer alteração patológica ou experimental levantando a destruição de hepatócitos era capaz de desencadear o processo de proliferação hepatocelular (ALOIA, 2006).

A degeneração hidrópica ocorre devido a um distúrbio do metabolismo proteico celular, é um lesão aguda do hepatócito, precedida de tumefação e seguida de formação de vacúolos de bordas indistintas na célula, devido a essa alteração provocar uma tumefação acentuada e danos graves aos hepatócitos. A degeneração hidrópica pode por vezes ser denominada “degeneração balonosa” (SANTOS e ALESSI, 2011).

A degeneração hidrópica é resultante de agressões tóxicas, metabólicas e hipóxicas que levam a insuficiência da bomba de sódio e potássio da membrana celular, o fluxo de água e sódio resultante expande os compartimentos membranosos das organelas como mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático (CHEVILLE, 2009; STOCKHAM, 2011).

Segundo Aguiar et al. (2011), a regeneração do fígado é um processo que envolve hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do volume celular ou do conteúdo proteico na fase de pré-replicação).

O processo de regeneração pode ser classificado em três etapas. A primeira etapa compreende o estágio inicial quando os hepatócitos adquirem a capacidade de replicação. A segunda etapa é a proliferação, período no qual o número de células hepáticas aumenta, buscando uma quantidade adequada para a restituição da função do fígado. A terceira e última etapa é a terminação, período em que a divisão celular é encerrada após atingir o volume de células necessárias para a restituição da função ou o peso original do órgão (FAUSTO, 2004; FAUSTO et al., 2006; AGUIAR et al., 2011). A perda do parênquima rapidamente desencadeia o processo regenerativo.

Em roedores a capacidade de regeneração é tão acentuada que, após a retirada de cerca de 70-75% do órgão, ele se regenera voltando ao seu tamanho normal em quatro semanas. Em ratos, somente um hepatócito, entre cerca de 20.000 pode estar se dividindo em qualquer momento. Durante sua vida adulta do roedor, o hepatócito divide-se poucas ou raras vezes. Entretanto, sua capacidade de replicação não se perde (ALOIA, 2006).

Todas as células hepáticas participam do processo regenerativo, mas a maioria dos estudos focam os hepatócitos uma vez que estes constituem cerca de 90% da massa hepática e 60% do número total de células (RAMALHO et al., 1993).

O mecanismo de regeneração é controlado pelo fator de transformação de crescimento, fator de crescimento da epiderme, interleucina-6 (I-6) e fator de crescimento dos hepatócitos. A maioria destes fatores são liberados pelas células estreladas armazenadoras de gordura (Células de Ito) situadas no espaço de Disse, embora, o fator de crescimento de hepatócitos esteja ligado a heparina na escassa matriz extracelular do fígado. Na maioria dos casos a capacidade de replicação dos hepatócitos restantes é responsável pela regeneração; entretanto, quando a lesão hepatotóxica é demasiadamente grande, a regeneração do fígado ocorre pela atividade mitótica das células ovais dos colangiolois e dos canais de Hering (RAMALHO et al., 1993, GARTNER e HIAT; 2003).

Qualquer que seja a natureza destes fatores, eles parecem ser precisos, uma vez que o crescimento cessa quando o fígado atinge seu peso original (FAUSTO et al., 2006).

2.4 – Células tronco mesenquimais na regeneração hepática

As Células Tronco Mesenquimais (CTM) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgão parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; DEL CARLO et al., 2009; MONTEIRO, et al., 2009; PINTO FILHO et al., 2013). A MO é o tecido mais

utilizado para a obtenção das CTMs e caracterizado para o estudo das propriedades das células-tronco e foi o primeiro tecido empregado para o estudo das terapias celulares (PINTO FILHO et al., 2013).

Em cultura e condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastóide, com formato fusiforme, adesão a substrato plástico, autorrenovação e são capazes de se diferenciar e dar origem a osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, células renais e células cardíacas dentre outras (MONTEIRO et al., 2009). Por esse motivo acredita-se que esse tipo de célula é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo. Acredita-se que estas células desempenham um papel importante na regeneração de diversos órgãos após injúria (MEIRELLES et al., 2008)

As células tronco apresentam um grande potencial no tratamento de diversas doenças, sejam elas congênicas/hereditárias ou adquiridas em animais e seres humanos (PINTO FILHO et al., 2013).

A regeneração hepática pode ocorrer por três formas. A primeira são os hepatócitos maduros, que respondem rapidamente à lesão hepática e constituem portanto, a primeira linha de regeneração. A segunda fonte é ativada quando um dano crônico ou extenso acomete o fígado, e os hepatócitos não são capazes de responder a tal injúria, as células ovais (como são chamadas em modelos murinos ou células progenitoras hepáticas em humanos) são as responsáveis por reparar o fígado. A terceira forma são as células tronco originadas de fontes extra-hepáticas com, por exemplo, a medula óssea ou outros tecidos (RAMALHO et al., 1991; BETTIO, 2010; RIEHLE et al., 2011).

A utilização deste tipo de terapia celular poderia ser uma alternativa ao transplante hepático, uma vez que, é o tratamento primário para várias doenças

hepáticas em estágio final, mas é impedido pela falta/escassez de doadores de órgãos e por complicações associadas à rejeição e imunossupressão (KUO et al., 2008 e BETTIO, 2010).

3 - OBJETIVOS

3.1- *Objetivos gerais:*

Avaliar o efeito do tratamento de células tronco mesenquimais sobre a lesão hepatocelular medicamentosa induzida por griseofulvina em ratos

3.2- *Objetivos específicos:*

- 1- Validar histopatologicamente um modelo murino de lesão hepatocelular medicamentosa por meio da administração diária de griseofulvina na dose de 250mg/kg, durante 30 dias
- 2- Mensurar, por meio de histomorfometria, o percentual de degeneração hidrópica, necrose, congestão, figuras de mitoses, presença ou ausência de hepatócitos binucleados.
- 3- Aferir o efeito da administração endovenosa de $1,2 \times 10^6$ de células tronco mesenquimais sobre a variável degeneração hidrópica.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Protocolo de ética: O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação com Animais, da Universidade Vila Velha (UVV), protocolado no registro 254/2013 e em consonância às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Animais de experimentação: Foram utilizados 29 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com oito semanas de idade, machos e com peso médio de 300 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente com controle de umidade (55%), temperatura (23°C) e fotoperíodo de 12 horas automáticos, alojados em quarteto em caixas com dimensões 414mm x 344mm x 168mm, e com acesso irrestrito a uma dieta padrão para roedores e água filtrada em bebedouros de 700mL, no Laboratório de Acompanhamento Experimental da Universidade Vila Velha (UVV).

Antes das etapas experimentais, todos receberam vermífugo na dose de 0,4mg/Kg de Ivermectina 2% (Mectimax Duo Ivermectina® 2% - União Agener – São Paulo- Brasil) via oral, acrescido aos bebedouros com 300ml de água e com repetição aos 8 e 10 dias conforme descrito por Santos (2012).

4.3 Isolamento, caracterização e expansão das CTM: Para esta fase foram utilizados dois ratos Wistar filhotes, como doador de CTM, conforme metodologia descrita por Monteiro et al. (2012). Essa etapa foi realizada em parceria com colaboradores da Universidade federal de Viçosa (UFV) e do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva, até a sobredosagem de isoflurano. Foi realizada tricotomia do abdômen e membros pélvicos e em seguida os animais foram transferidos para capela de fluxo horizontal. Foi realizada dissecação da musculatura do quadríceps e o fêmur do antímero direito e esquerdo foi retirado de forma asséptica. As epífises distais foram seccionadas e na epífase proximal foi acoplado uma agulha (23G) e uma seringa de 10 mL contendo meio de cultura DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco), acrescido de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA) (Gibco, Paisley, UK) e apresentando pH 7,2, para lavar o canal medular.

As células foram plaqueadas inicialmente na concentração de 5×10^6 células em frascos de cultura celular de 75 mm^2 (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 . O aumento do número de células foi acompanhado diariamente, com auxílio de microscópio invertido. Os meios de cultura foram trocados mediante a necessidade e as tripsinizações e passagens realizadas quando visualizado 80% de expansão celular nas placas, até a quarta passagem.

Uma alíquota das células da quarta passagem foi caracterizada por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular para CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54, utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

Outra alíquota de células de quarta passagem foi submetida a etapas de diferenciação osteogênica. As células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de seis poços, com lamínulas de 22 mm de diâmetro, com meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma, St Louis MO, USA), 5,0 μ g/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e 10,0mmol/L de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e incubado a 37°C por quatro semanas. No 30º dia após a colocação das células no meio osteogênico as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

Após a quarta passagem, as células foram tripsinizadas, observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Neubauer e aliquotadas na concentração de $1,2 \times 10^6$ células/0,5 mL de PBS em seringas de 1mL. Após preparada, a alíquota foi administrada imediatamente.

4.4 Estudo *in vivo*: Os demais 27 animais foram pesados individualmente e identificados com brincos de numeração na orelha esquerda. Todos os animais foram submetidos à administração diária de griseofulvina (250mg/mL em veículo inócuo, Farmácia de Manipulação Vida Animal, Vitória-ES), na dose de 250mg/kg, por via oral, durante 30 dias, acrescido de 0,1ml de azeite de oliva para que a absorção do fármaco tivesse sua absorção aumentada conforme metodologia proposta por Gaunt. A administração do fármaco griseofulvina e do azeite de oliva foi realizada com o auxílio de uma seringa de 1,0mL e realizada sempre no mesmo período do dia, pela manhã. Durante esses 30 dias, os animais foram acompanhados diariamente e

avaliados quanto os parâmetros peso, ingestão hídrica, alterações gastrointestinais (diarreia e emese) e neurológicos (síncope, epilepsia, deambulação).



Figura 2: Imagem demonstrando um rato Wistar contido manualmente recebendo o fármaco grisefulvina.

Ao final dos 30 dias, 3 animais foram eutanasiados em câmara de gás, com sobredose anestésica, para hepatectomia total e realização de estudo histopatológico da arquitetura hepática e os demais 24 ratos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos de 12 animais e tratados conforme descrição:

- O grupo testemunha (GT): animais tratados com 0,5mL de PBS, em aplicação única, por via parenteral, pela veia lateral da cauda.

- O grupo células tronco mesenquimais (GCTM): animais tratados com infusão de $1,2 \times 10^6$ CTM, num volume final de 0,5mL de PBS, em aplicação única, por via venosa, pela veia lateral da cauda.



Figura 3: Animal do grupo GCTM, recebendo a infusão de células tronco mesenquimais pela veia da lateral da cauda.

Após os tratamentos, os animais foram acompanhados por mais 15 dias e avaliados quanto os parâmetros peso, ingestão hídrica, alterações gastrointestinais e neurológicos, durante todo o período do experimento.

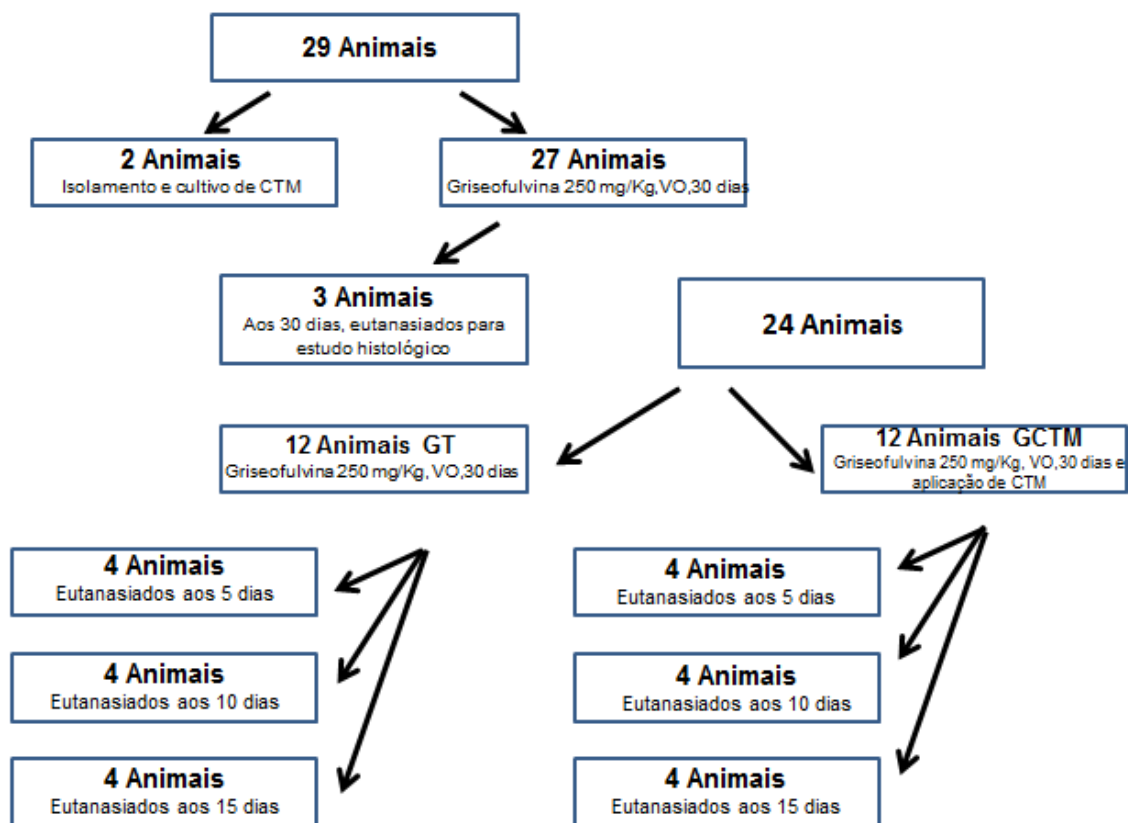


Figura 4: Organograma demonstrando os animais de experimentação e como eles foram alocados nas diferentes etapas do estudo.

4.5 Estudo Histopatológico: Quatro animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente, identificados, pesados e submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica com Isoflurano, nos dias 5, 10 e 15 após a aplicação de CTM. Em seguida os animais foram contidos em decúbito dorsal em mesa cirúrgica para hepatectomia .

Foi selecionada a região central do lóbulo medial direito e lateral esquerdo para serem feitas as amostras a serem analisadas histopatologicamente. Coletou-se os maiores lobos após o órgão ter sido condicionado em solução de

paraformaldeído tamponado. As amostras de fígado foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 10% por 24 horas e, em seguida, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol, incluídas em parafina histológica e seccionadas em micrótomo rotativo, ajustado para 4µm de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE) para posterior avaliação. Estas lâminas foram submetidas a uma análise descritiva onde foi observada a presença ou ausência de congestão, degeneração hidrópica, infiltrado leucocitário, necrose, esteatose de hepatócitos, fibrose hepática, hepatoma ou carcinoma de hepatócitos. Além disso, por meio de uma imagem de 5mm², obtidas por um microscópio óptico, na objetiva de 40x das lâminas de cada indivíduo dos grupos, foi realizado uma análise quantitativa morfométrica da variável degeneração hidrópica, por um avaliador cego, que analisou 4 pontos de 1 mm² desta imagem. As imagens foram realizadas em locais distantes da cápsula do órgão e em regiões próxima à uma tríade portal.

4.6 Análise estatística: A tabulação dos dados e avaliação estatística foi realizada com o auxílio de planilhas eletrônicas do Excel ®. Os valores da variável degeneração hidrópica foram comparados entre os tempos de avaliação histológica, dentro os diferentes tratamentos (5, 10 e 15 dias pós-tratamento com CTM ou PBS). O valor dessa variável foi submetido ao teste de ANOVA (Análise de variância) e uma análise de comparação múltipla utilizando Tukey. Para os dados estatísticos foi adotado um nível de rejeição de hipótese de nulidade de 5% ($p \leq 0,05$).

5- RESULTADOS

5.1- Cultura Celular

A medula óssea foi capaz de propiciar uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas, não aderentes, nas primeiras 24 horas. A partir do oitavo dia, a população celular apresentava-se mais homogênea, com predominância das células aderentes de morfologia fibroblastóide, organizada em colônias.

A citometria de fluxo foi realizada com uma amostra de cultura de quarta passagem e demonstrou que cerca de 43% das células homogêneas revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 e 93,89% de CD45 e expressão positiva para 99,0% de CD90 e 93,89% de CD90 e 95,8% de CD54 (Figura 4).

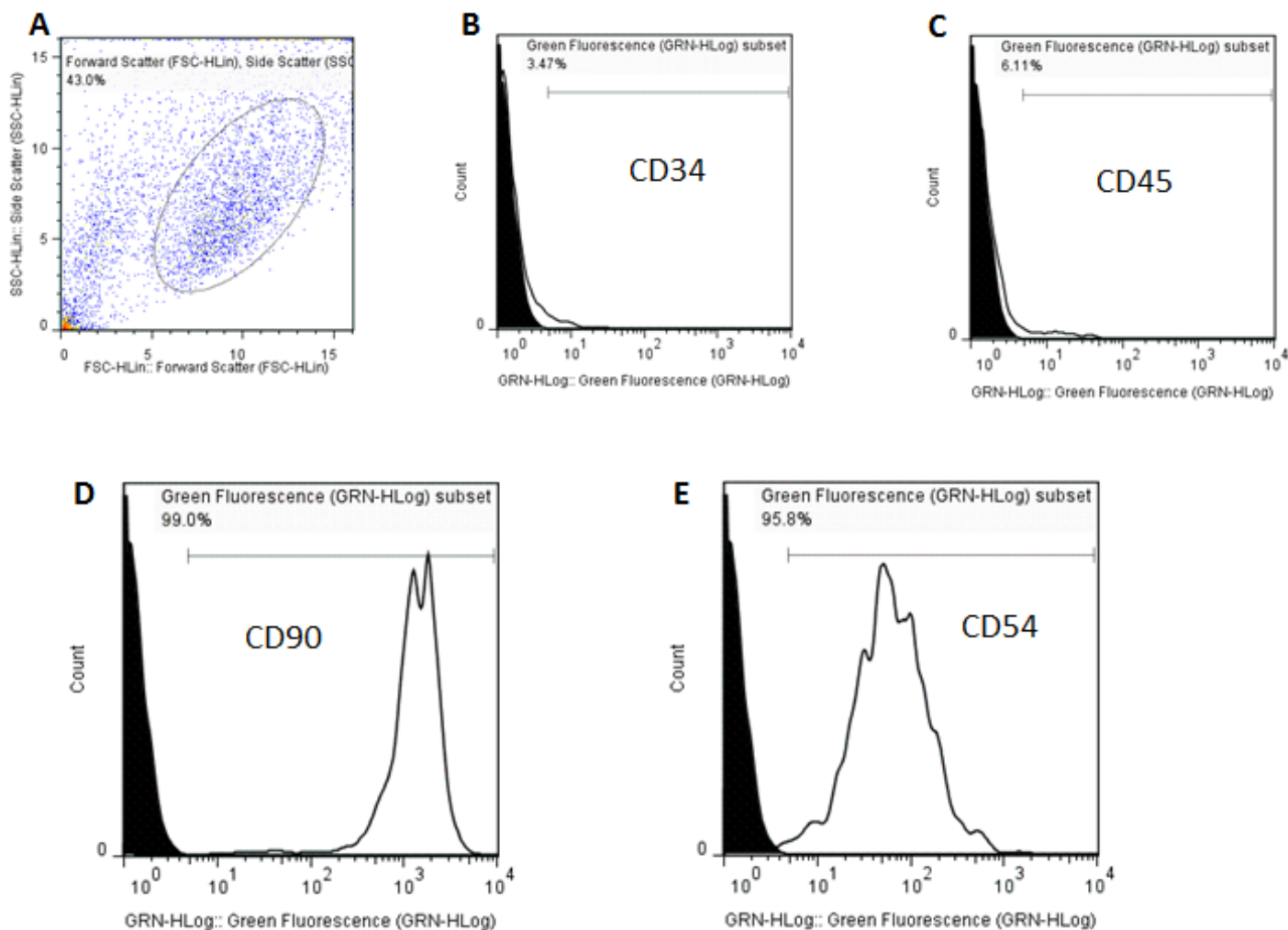


Figura 5: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais (MSC) oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) esta comparada com os isotipos controle (gráfico preto). O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo positivo quando as células ultrapassam 10 de células avaliadas durante o evento. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para o estudo (R1), que representou 43% de homogeneidade. As amostras da cultura revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 (B) e 93,89% de CD45 (C) e expressão positiva para 99,0% de CD90 (D) e 95,8% de CD 54 (E).

5.2- Alterações Clínicas

Durante o uso da griseofulvina ao longo dos 30 dias de sua administração foi observado polidipsia e polifagia e ganho de peso. Ao iniciar o projeto o peso dos animais era em média 300g, ao término do experimento o peso dos mesmo animais era em média 340g. Os animais ganharam portanto, em média, 10g de peso por semana do experimento. As alterações clínicas observadas durante este período no experimento foram diarreia líquida a pastosa de coloração amarronzada em 2 dos 26 animais por 2 dias, com 17 dias de experimento. Após este período as fezes voltaram ao normal não havendo outras alterações clínicas nos indivíduos durante o experimento.

Após os tratamentos não foi observado nenhuma alteração de peso, ingestão de água ou comportamento.

5.3- Alterações Histopatológicas

Aos 30 dias de administração de griseofulvina foram eutanasiados 3 animais, onde histopatologicamente, na coloração de HE, foi possível observar a presença de plasmócitos próximo ao ducto biliar, citoplasma dos hepatócitos com aspecto “nebuloso”, presença de hepatócito binucleados e figuras de mitose em hepatócitos

próximo ao canalículo biliar. As lâminas do animais eutanasiados com 5 dias e tratados com PBS (grupo GT) foi possível observar a presença de denegação hidrópica, raras figuras de mitose em hepatócitos e os mesmos hepatócitos com o citoplasma com aspecto “nebuloso” e congestão hepática. O grupo GCTM, que foram eutanasiados com 5 dias de tratamento, hepatócitos onde a cromatina do núcleo apresentava-se de forma grosseira, degeneração hidrópica e congestão hepática. O grupo GT eutanasiados com 10 dias de tratamento foi possível observar núcleo hiper Cromático, células ovais perto dos canalículos biliares e presença de congestão e degeneração hidrópica um pouco mais branda que os animais do mesmo grupo com 5 dias de eutanasiados. O grupo GCTM aos 10 dias pós-tratamento foi observado denegação hidrópica discreta e congestão hepática semelhante ao grupo GT com 10 dias. Os animais do grupo GCTM 15 dias pós-tratamento foram observados uma quantidade menor de degeneração hidrópica e poucas regiões com congestão hepática quando comparada com os outros dois grupos. Já o grupo GT com 15 dias de tratamento com PBS, não houve diferença quanto a presença das alterações previamente citadas.

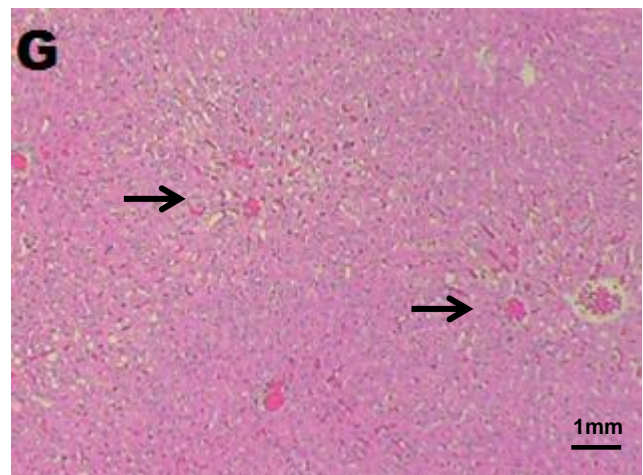
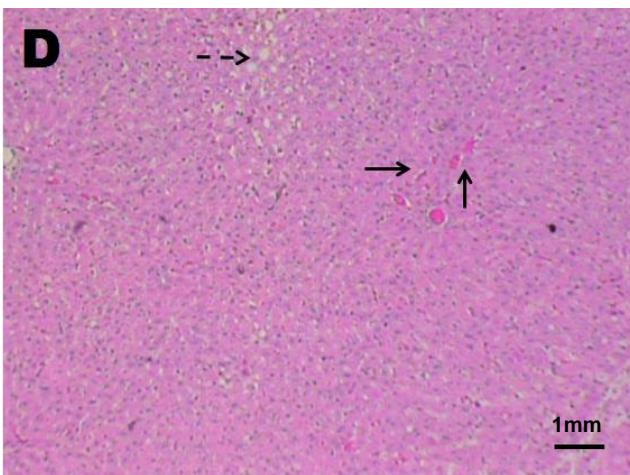
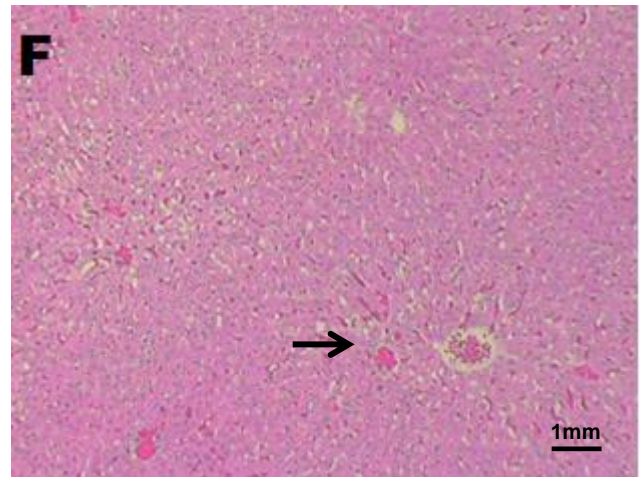
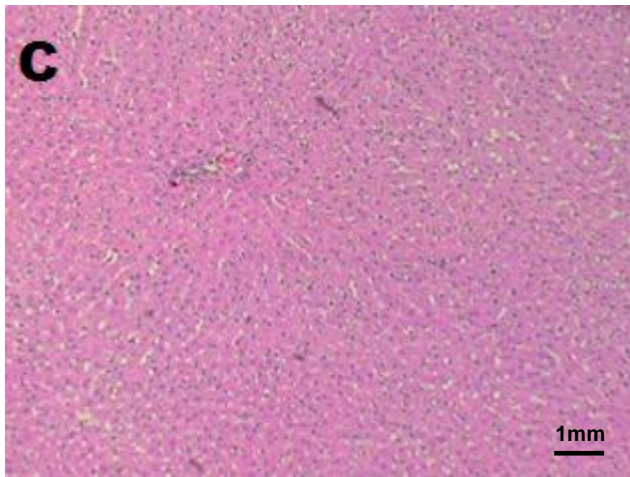
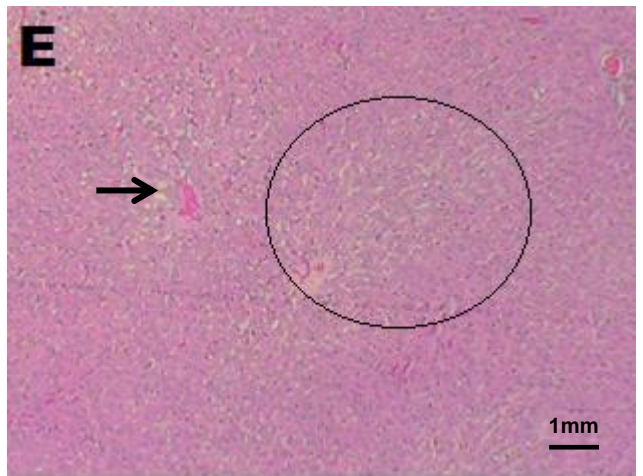
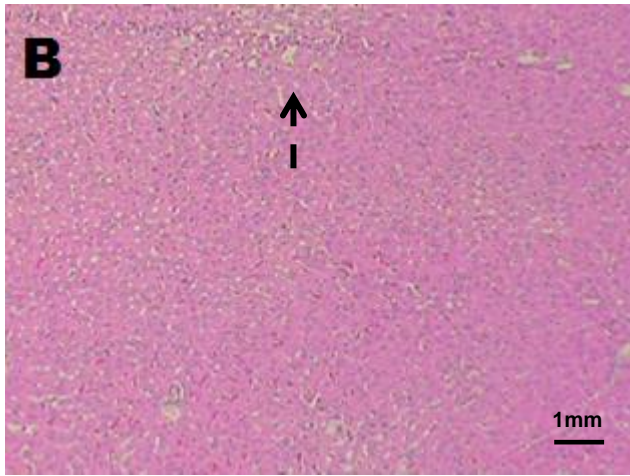
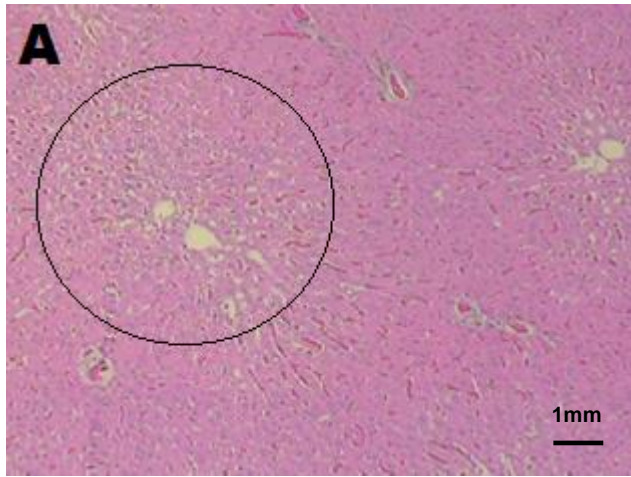


Figura 6: Aspecto histológico do fígado de ratos Wistar alocados no experimento. A) Grupo controle dia 0- No interior do círculo a presença de degeneração hidrópica e na seta preenchida a presença de congestão; B) GCTM 5 dias - presença de degeneração hidrópica no canto superior da mesma, demonstrada pela seta tracejada C) GCTM 10 dias- Presença de degeneração hidrópica difusa por toda a imagem; D) GCTM 15 dias – Pouca degeneração hidrópica demonstrada pela seta tracejada no canto superior da imagem e presença de congestão em seta preenchida; E) GT 5 dias – Presença de degeneração hidrópica no interior do círculo e com seta preenchida a presença de congestão; F) GT 10 dias: Presença de degeneração hidrópica difusa por toda a imagem com presença de congestão demonstrada pela seta preenchida. G) GT 15 dias: Presença de degeneração hidrópica por toda a imagem e congestão demonstrada pela seta preenchida.

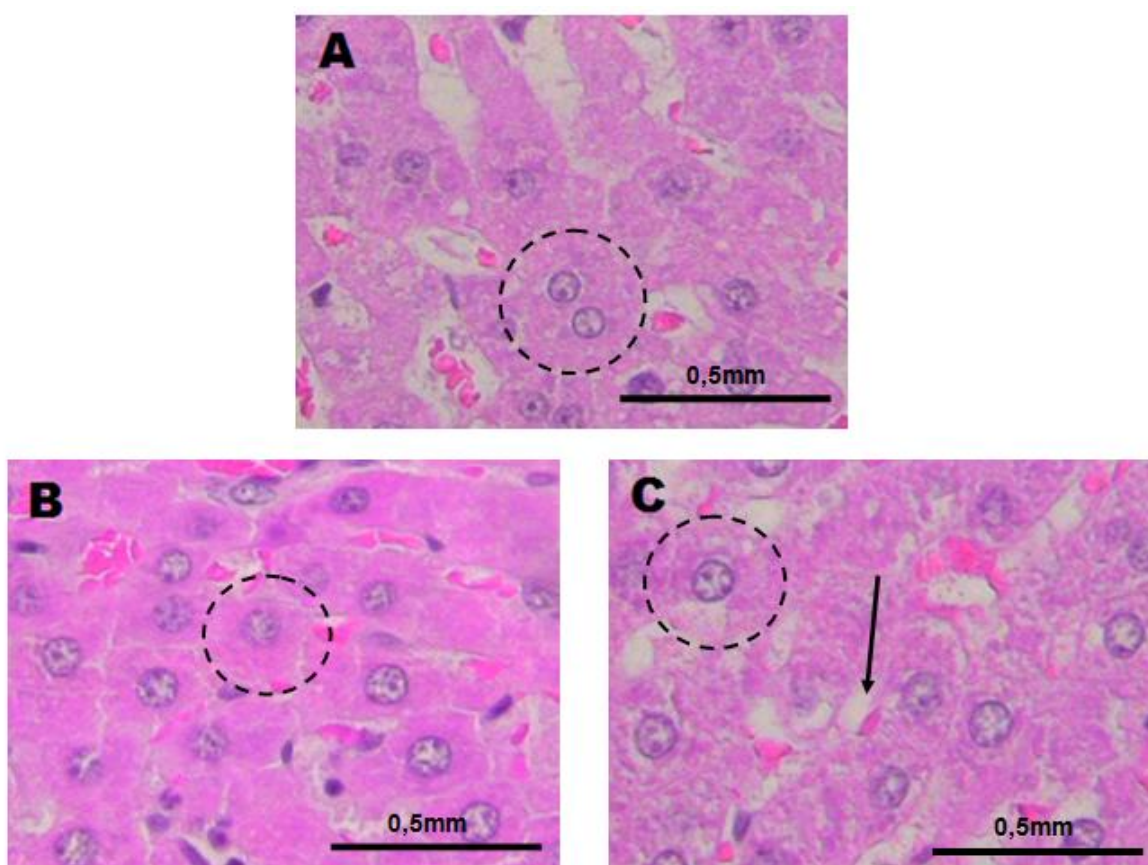


Figura 7: Aspecto histológico do fígado de ratos Wistar alocados no experimento em maior aumento. A)GT no dia 0, com presença de hepatócito com “aspecto nebuloso” e binucleado em círculo tracejado. B) GCTM no dia 15, círculo tracejado mostra a aparência de um hepatócito com menor frequência de alterações em citoplasma. C) GT 15 dias, presença de hepatócito com “aspecto nebuloso” em círculo tracejado; Presença de degeneração hidrópica em seta preenchida.

Conforme gráfico a seguir (Figura 8) foi possível através da análise quantitativa morfométrica a quantificação da presença de degeneração hidrópica onde é possível observar no gráfico abaixo, uma diferença significativa quanto a resposta ao tratamento com células tronco no grupo GC aos 15 dias de experimento e grupo GCTM aos 15 dias de experimento.

Tabela 1: Apresenta quantidade de degeneração hidrópica por mm² dos animais dos grupos do experimento nos dias 5, 10 e 15 dias pós- tratamento.

Grupos	Dias pós-tratamento		
	5 dias	10 dias	15 dias
GT	1,4	1,0	1,8
	1,2	1,6	1,4
	1,4	1,4	1,2
	1,2	1,0	2,0
GCTM	1,4	0,4	0,2
	1,0	0,8	0,6
	1,4	1,0	0,2
	0,2	0,6	0,4

5.4 Avaliação estatística

A análise estatística da variável degeneração hidrópica nos grupos GT e GCTM, nos dias 5, 10 e 15 dias pós-tratamento, demonstrou que houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com CTM e o tratado com PBS.

A variável analisada, foi possível perceber que aos 15 dias pós-tratamento no grupo GCTM houve uma diferença quanto ao grupo GT, que nos permite inferir que a quantidade de degeneração hidrópica diminuiu.

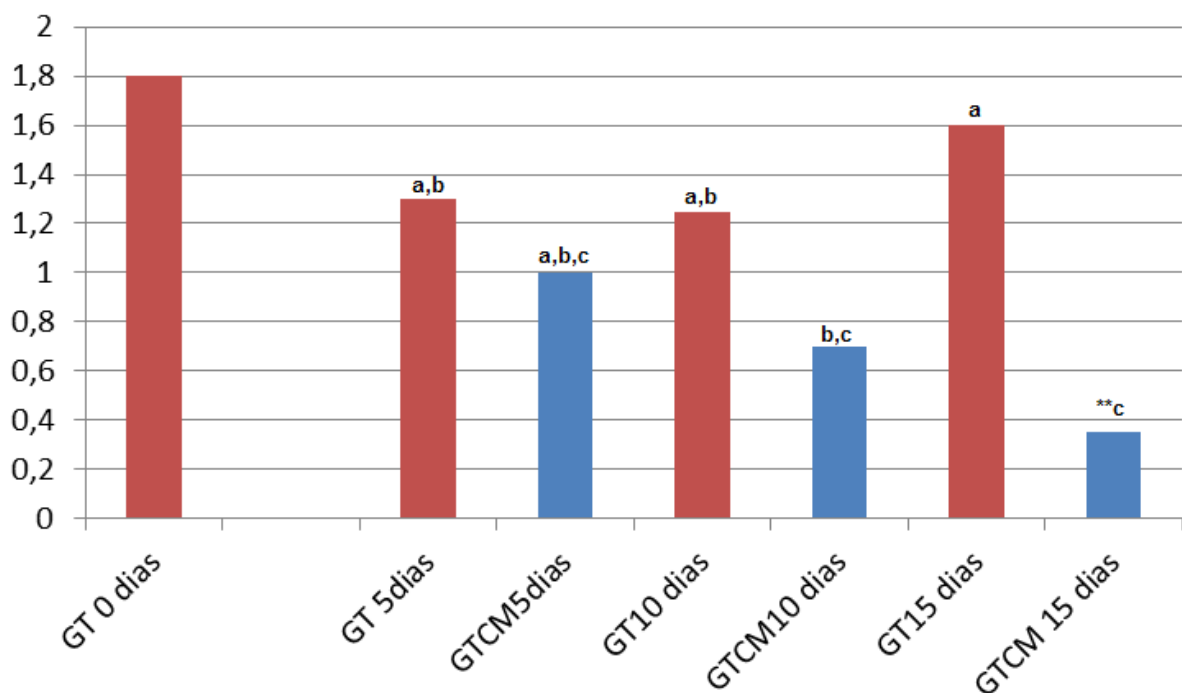


Figura 8: Gráfico demonstrando as lesões por mm² no eixo x, nos dias 5, 10 e 15 dias pós-tratamento com CTM ou PBS no eixo y.

5- DISCUSSÃO

A griseofulvina é pouco utilizada na clínica de pequenos animais, todavia, de acordo com Carpenter (2010), para ratos este fármaco tem se mostrado eficiente e seguro para a utilização na dose de 250mg/kg, entretanto quando utilizado na dose 10 vezes maior e administrada por um longo período de tempo pode causar alterações na arquitetura do fígado. No presente estudo utilizando a dose de 205mg/kg também verificamos alterações na morfologia hepática.

No presente experimento, optou-se pelo uso de azeite de oliva para que a absorção do fármaco fosse estendida. A presença de alimento rico em gordura proporciona o aumento da absorção, uma vez que a griseofulvina possui baixa solubilidade em água (PAPICH, 2009).

A griseofulvina pode causar hiporexia, anorexia, vômito, diarreia, icterícia, neurotoxicidade e o aparecimento de tumores em tireoide e fígado quando este fármaco é utilizado por um longo período (DeMATTEIS et al., 2003; NOGUEIRA e ANDRADE, 2011). Foi observado diarréia líquida-pastosa em 2 animais (6,9%), este sinal clínico foi auto-limitante, contudo os indivíduos acometidos apresentaram ganho de peso ao final do experimento.

Lesões crônicas em fígado podem ser causadas por diversos fatores como fármacos, vírus, parasitas, álcool, intoxicação por metais pesados entre outros. Esse tipo de lesão pode levar a presença de anormalidades na morfologia hepática como a apoptose, necrose, colestase, inflamação e fibrose (GANT et al., 2003). Observamos que a griseofulvina acarretou alterações morfológicas no fígado como degeneração hidrópica e congestão hepática, entretanto, não podemos afirmar que

houve prejuízos no funcionamento hepático, uma vez que não realizamos mensurações bioquímicas da atividade hepática (celular e enzimática).

Gant et al. (2003) realizaram um estudo com ratos machos para verificar as alterações hepáticas causadas por griseofulvina, administrada na ração durante 22 dias. Verificaram a presença de inflamação local, acompanhada pela deposição de um pigmento castanho-avermelhado (fotoporfiria) com um dia de administração do fármaco, aos 15 dias observaram a presença de inflamação próximo ao espaço porta e aos 22, locais de necrose em parênquima hepático. Discordando dos achados destes autores não constatamos a presença de processo inflamatório nos animais do grupo controle, aos dias 0, 5, 10 e 15. Observou-se degeneração hidrópica, hepatócitos binucleados e hepatócitos com aspecto “nebuloso” sugerindo degeneração. Possivelmente a discrepância de resultados foi decorrente a dose do fármaco e a forma de disponibilidade do fármaco.

No grupo GCTM, sobretudo aos 15 dias, foi observado discreta congestão hepática e menor degeneração hidrópica comparando aos demais grupos experimentais. De forma similar, Parekkadan et al. (2007) observaram redução de infiltrado leucocitário assim como redução da necrose e congestão hepática e da duplicação das vias biliares em ratos com insuficiência hepática aguda induzidas tratado com CTM, possivelmente pelo fato das CTM inibirem a capacidade das células imunes (leucócitos e linfócitos) em invadir o tecido lesionado.

Estudos recentes descrevem a utilização alógena e autógena das CTM para a reparação de diversos tecidos (MONTEIRO et al., 2009), no entanto, a capacidade destas células em restaurar o tecido hepático ainda não é bem esclarecida (PENTEADO et al., 2007).

Duncan et al. (2009), afirmaram que, *in vitro*, as células tronco humanas e de ratos podem ser induzidas à diferenciação em células da linhagem hepática, em condições específicas de cultura. Penteado et al. (2007) também realizaram diferenciação, *in vitro*, de células tronco isoladas da medula óssea de humanos e induzidas a diferenciação, observando morfologia semelhante à hepatócitos, contudo, as células não foram capazes de expressar três dos principais marcadores hepatocíticos.

Mesmo não realizando o transplante de células tronco *in situ*, diretamente sobre o tecido hepático, e optando pela aplicação intravenosa, pela veia da cauda do rato, observamos no grupo tratado houve uma tendência a recuperação da arquitetura hepática. De acordo com Duncan et al. (2009) as células-tronco possuem potencial migratório para o tecido hepático danificado mediante interações moleculares deste grupo celular com os locais de injúria.

Sabe-se que as CTM secretam uma grande variedade de quimiocinas, além de expressar receptores para citocinas e fatores de crescimento, interagindo com as células residentes do tecido hospedeiro e induzindo-as, por mecanismos parácrinos à quimiotaxia, ativação e a se diferenciação de acordo com essa sinalização (MONTEIRO et al., 2009). Recentemente, Araújo (2013), inferiu, como mecanismo de ação das células-tronco a sinalização telécrana, reforçando os benefícios das terapias celulares por vias venosas.

Outro mecanismo proposto para a diferenciação celular derivado das CTM é a fusão. Acredita-se que estas células podem fusionar-se a uma célula adulta-alvo, assumindo o padrão de expressão gênica da célula adulta a qual se uniu. A fusão celular é um fenômeno biológico amplamente conhecido e ocorre principalmente em células cuja poliploidia é comumente vista, como os hepatócitos (HERZOG et al.,

2003, MEIRELLES et al., 2006, MONTEIRO et al., 2009), fato também que pode justificar os resultados encontrados.

Em relação ao nicho celular, quanto mais agudo for o processo patológico e/ou quanto maior for a vascularização da região lesionada , mais intensa e mais efetiva será a sinalização/interação com as células tronco (FUCHS et al., 2004; GHAEMI et al., 2013) e por este motivo, contraindicamos a aplicação de células-tronco *in situ*, uma vez que o tecido apresenta características degenerativas .

As hepatotoxinas produzidas pela griseofulvina possivelmente mediaram lesões oxidativas acarretando dano em DNA, morte celular e lesões endoteliais, justificando o extravasamento sanguíneo em interstício hepático (congestão), de intensa observação no dia 0 e no grupo controle. Já no grupo GCTM a frequência observada de congestão, mormente aos 15 dias, foi considerada baixa. As CTM possuem uma resistência maior ao estresse oxidativo, comparando-se às demais opções de tratamento utilizadas nos tempos atuais. As moléculas bioativas secretadas pelas CTM exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando: efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomodulatórios sobre as células do sistema imune, aumento da angiogênese, e quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação (KUO et al., 2008; MEIRELLES et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009) acarretando diminuição da congestão observada nos animais tratados com CTM neste experimento.

Assim, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial, em algumas doenças isquêmicas, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares (MONTEIRO et al., 2009).

7-CONCLUSÃO

Sob as condições que foram realizadas este experimento, pôde-se constatar:

- Que a griseofulvina na dose 10 vezes maior que a recomendada em ratos causa degeneração hidrópica no fígado, no entanto, tal lesão permaneceu ao longo da avaliação do experimento mas não foram incompatíveis com a vida dos animais;

- Que o uso do infusão de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea contribuiu de forma positiva para reverter a degeneração hidrópica causada pela griseofulvina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L.R.R.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS, C.A.P.M.; CZECZKO, N.G.; RIBAS, M.M.; MARINHO JUNIOR, C.H.; WENDLER, E. Renegeração do fígado após hepatectomia parcial em ratos submetidos à hipertensão portal pós-hepática. *Arq. Bras. Cir. Dig.* v.24, n.2, p.144-151, 2011.
- ALOIA, T.P.A. *Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos Wistar (Rattus Novergicus)*. 2006. Dissertação (Mestrado) _ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARAÚJO, M.R. *Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos wistar tratados com células tronco mesenquimais-* 2013. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, MG.
- BALDAL, A.C., OTSUKA, M.. LARSSON, C.E. Ensaio Clínico da griseofulfina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em caes e gatos, *Ciência Rural*, v.37, n.3, p.750-754, 2007.
- BANKS, W.J. *Histologia Veterinária I*. São Paulo: Manole, 1991, p.468-479.
- BETTIO, J.A., *Transplante intraportal por via percutânea de células-tronco da medula óssea em ratos cirróticos: Exequibilidade e eficácia*. 2010. Dissertação (Mestrado) _ Faculdade de Medicina e Ciências da saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BYDLOWSKI, S. P. ; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F. ; JANZ, F. L. Características biológicas das Células-Tronco Mesenquimais. *Ver. Bras. Hematol. Hemotec.* v.31, p.25-35, 2009.
- CAMPOS, D.F.; DABUS, D.M.M.; LIMA, G.S.; TRETIN, T.C.; LÉO, V.F.; PEREIRA, D.M. Hepatotoxicidade dos antifúngicos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. n.12, 2009.
- CARPENDER, J.W. *Formulário de animais exóticos*. 3ª ed.. São Paulo: Medvet. 2010. p.385.
- CHEVILLE, N.F. *Introdução à Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2009.
- DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicâncias. *Ver. Ceres*, v.56, n.4, p.446-450, 2009.
- DeMATTEIS, F.; DONELLY, A.J.; RUNGE, W.J. The effect of Prolonged Administration of Griseofulvin in Mice with Reference to Sex differences. *Cancer Reserch*. v.26, n.1, p.721-726, 1966.
- DUNCAN, A.W.; DORRELL, C.; GROMPE, M. Stell Ctell and Liver Regeneration. *Gastroenterology*. v.137, n.2, p. 466-481. 2009.

- FAUSTO, M.; Liver Regeneration and Repair: Hepatocytes, Progenitor Cells, and Stem Cells. *Science Frontier*. p.1477-1487, 2004.
- FAUSTO, N.; CAMPBELL, J.S.; RIEHLE, K.J. Liver Regeneration. *Hepatology*. v.43, p. 45-53, 2006.
- FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASH, G. Socializing with the Neighbors: Stem Cells and Their Niche. *Cell*, v.116, p.769-778, 2004.
- GANT, T.W.; BAUS, P.R.; CLOTHIER, B.; RILEY, J.; DAVIES, R.; JUDAH, D.J.; EDWARDS, R.E.; GEORGE, E.; GREAVES, P.; SMITH, A.G. Gene Expression Profiles Associated with Inflammation, Fibrosis, and Cholestasis in Mouse Liver after Griseofulvin. *Toxicogenomics*, v.111, p.6, p. 847-853.
- GARTNER, L.P.; HIAT, L.P. *Tratado de Histologia*, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.456.
- GHAEMI, R.S.; DELALAT, H. F.J.; GRONTHOS, B.; VOELCKER, S. N.H. Exploring the mesenchymal stem cell niche using high throughput screening. *Biomaterials*, v. 34, n. 31, p. 7601-7615.
- HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, v.102, 2013, p. 3483-3493, 2003.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.488.
- KNASMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; HELMA, C.; KASSIE, F.; ECKER, S.; SCHULTE-HERMANN, R. Toxic Effects of griseofulvin: disease model, Mechanisms and Risk Assessment. *Cancer Research*, v.27, n.5, p.495-537, 1997.
- KUO, T. K.; HUNG,S.P.; CHUANG, C.H.; CHEN, C.T.; SHIH, Y.V.; FANG, S.C.; YANG, V.W.; LEE, O.K. Stem Cell Therapy for liver disease: Parameters Governing the Success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Gastroenterology*. V.134, n.7, p.2111-2121, 2008.
- MEIRELLES, L.S. CHANGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v.119, p.2204-2213, 2006.
- MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.26, p.2287-2299, 2008.
- MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO,R.J. Células-tronco Mesenquimais. *Ciência Rural*. v. 40, n.1, p. 238-245, 2009.
- MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO-NETO, N.M.; NARDI, N.B.; CHAGASTELLES, P.C.; CARVALHO, P.H.; BONFÁ, L.P.; FILGUEIRAS, R.R.; REIS, A.S.; DEL CARLO, R.J. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. V..84, p.841-851, 2012.
- NAUTA, A.J. FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. *Blood*, v.110, p. 3499-3506, 2007.
- NOGUEIRA, R.M.; ANDRADE, S.F. *Manual de toxicologia veterinária*. São Paulo: Roca, 2011, p.257.

- PAPICH, M.G. *Manual Saunders Terapêutico Veterinário*, 2ªed, São Paulo: MedVet, 2009.
- PAPICH, M.G., HEIT, M. RIVIERE, J.E. Fármacos antifúngicos e antivirais. In _____ *Farmacologia e Terapêutica Veterinária*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.767-779.
- PARAKKADAN, B.; POLL, D.V.; SUGANAMA, K.; CARTER, E.A.; BERTHIAUME, F.; TILLES, A.W.; YARMUSH, M.L. Mesenchymal Stem Cell-Derived Molecules Reverse Fulminant Hepatic Failure. *Plos One*, v.2 ,n.9, p.1-6, 2007.
- PENTEADO, F.C.L.; ORELLANA, M.D.; FONTES, A.M.; KASHIMA, S.; COOVAS, D.T. Diferenciação hepatocítica de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.28, n.3, p. 325-334, 2007.
- PINTO FILHO, S,T,L; TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURU JUNIOR, J.S.; ROSA, M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Veterinária e Zootecnia*. v.20, p.49-59, 2013.
- RAMALHO, F.S.; RAMALHO, L.N.Z.; ZUCULOTO, S.; SILVA JR, O.C. Regeneração Hepática – Algumas definições um universo de incertezas. *Acta Cir. Brasil.*, v.8,n.4, p.177-189, 1993.
- RIEHLE, K.J.;DAN, Y.Y.; CAMPBELL, J.S.; FAUSTO, N. New Concepts in Liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* v.26, p. 203-212, 2011.
- SAMUELSON, D.A. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Elsevier: 2007. p.344-357.
- SANTOS, B.S. *Transplante de células tronco mesenquimais derivados do tecido adiposo no tratamento da lesão renal aguda por isquemia e reperfusão em ratos – 2012*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Vila Velha (UVV), Vila Velha, ES.
- SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C.; *Patologia Veterinária*. São Paulo: Roca, 2011.
- STOCKHAM, S.L. *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.562-587.
- WEBSTER, C.R.L. *Farmacologia Clínica*. São Paulo: Roca, 2005, p.84-85.