



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SANDRA MARIA FERREIRA**

**O EFEITO DO ALOPURINOL NA VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS MURINO,**  
***IN VITRO***

**CURITIBA**

**2007**

SANDRA MARIA FERREIRA



**O EFEITO DO ALOPURINOL NA VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS MURINO,  
*IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi

CURITIBA

2007

DIS  
610  
F383e  
2007  
ex 1



**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

Aos dezoito dias do mês de dezembro de 2006, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação **“O EFEITO DO ALOPURINOL NA VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS MURINO, *IN VITRO*”** apresentada por **SANDRA MARIA FERREIRA** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

<b>MEMBROS DA BANCA</b>	<b>ASSINATURA</b>
<b>Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi PUCPR – Presidente</b>	
<b>Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz PUCPR</b>	
<b>Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka Hosp. e Mat. Angelina Caron</b>	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

**Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi** Conceito: aprovado  
**Prof. Dr. Fábio Rueda Faucz** Conceito: aprovado  
**Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka** Conceito: aprovado  
**Conceito Final:** APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

---

---

---

---

Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Flavio Pecoits Filho  
Diretor do PPGCS PUCPR

## DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais, irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi, pela disponibilidade, e interesse na orientação deste trabalho;

A Dr<sup>a</sup> Cristina de Queiroz von Glehn, pelo incentivo;

Ao Prof. Dr. Carlos Aita pelo interesse e esforço para a otimização das técnicas, bem como inúmeros conselhos para o melhor andamento do projeto;

Ao Laboratório de Imunogenética que possibilitou que o sonho do mestrado se tornasse uma realidade;

Ao amigo Carlos Alves Fernandes, pelas intermináveis horas nos laboratórios de prática cirúrgica e cultivo celular, auxiliando e apoiando sempre;

Ao Prof. Dr. João Carlos Repka e ao Hospital Angelina Caron, onde demos os primeiros passos para a realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz que participou da banca e contribuiu com sugestões e informações que enriqueceram esse trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Cultivo Experimental PUC/PR;

Aos funcionários do Laboratório de Técnicas cirúrgicas, que estiveram sempre a nossa disposição e nunca deixaram faltar nada no momento das técnicas.

Ao departamento de Bioquímica pela liberação do Laboratório de Análises Clínicas, para a realização das análises bioquímicas;

A Prof<sup>a</sup>. Márcia Olandoski, pelos cálculos estatísticos e tabelas para o trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética pela torcida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>1 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>03</b>
1.1 – FÍGADO	<b>03</b>
1.2 - HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES	<b>04</b>
1.3 - TRANSPLANTE DE HEPATÓCITOS	<b>06</b>
1.4 - RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO	<b>07</b>
1.5 – ALOPURINOL	<b>10</b>
1.6 – DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA	<b>12</b>
1.7 – CULTIVO CELULAR	<b>13</b>
1.8 – CULTIVO DE HEPATÓCITOS	<b>16</b>
<b>2 – MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>18</b>
2.1 – ANIMAIS	<b>18</b>
2.1.1 – Delineamento da amostra	<b>18</b>
2.2 – PREPARO DOS ANIMAIS	<b>19</b>
2.3 – DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA	<b>21</b>
2.4 – RECUPERAÇÃO DOS HEPATÓCITOS	<b>23</b>
2.4.1 – Prática de 12/09/2005	<b>24</b>
2.4.2 – Prática de 02/11/2005	<b>24</b>
2.4.3 - Prática de 22/04/2006 e 03/07/2006	<b>24</b>
2.4.4 – Prática de 10/04/2006	<b>24</b>
2.5 – ACERTO DE CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE	<b>25</b>
2.6 – CULTIVO CELULAR	<b>27</b>
2.6.1. – Prática de 02/11/2005	<b>27</b>
2.6.2 - Prática de 10/04/2006	<b>27</b>
2.6.3 - Prática de 22/04/2006 e 03/07/2006	<b>27</b>
2.7 – ANÁLISES BIOQUÍMICAS	<b>28</b>
2.7.1 – Albumina	<b>28</b>
2.7.2 – Malondialdeído	<b>29</b>
2.7.2.1 – Curva de calibração	<b>30</b>
2.6 – MÉTODOS ESTATÍSTICOS	<b>31</b>
<b>3- RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>4 – DISCUSSÕES</b>	<b>39</b>
<b>5 – CONCLUSÕES</b>	<b>47</b>
<b>6- PERSPECTIVAS</b>	<b>48</b>
<b>7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

<b>8 – ANEXOS</b>	<b>56</b>
8.1 – Cultivo celular prática realizada em 26/04/2005(GE)	<b>56</b>
8.2 – Cultivo celular prática realizada em 26/04/2005(GC)	<b>56</b>
8.3 – Cultivo celular prática realizada em 10/04/2005(GE)	<b>57</b>
8.4 – Cultivo celular prática realizada em 10/04/2005(GC)	<b>57</b>
8.5 – Comparação entre hepatócito vivo, e morto	<b>57</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{l}$  – Microlitro

$\mu\text{M}$  – Micromolar

ADP – Adenosina di-fosfato

ALB – Albumina

AMP – Adenosina mono-fosfato

ATP – Adenosina tri-fosfato

cel – Célula

$\text{CO}_2$  – Gás carbônico

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

d. C. – depois de Cristo

DNA – Ácido dosoxirribonucléico

DP – Desvio Padrão

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

g – Grama

$G_0$  – Fase de repouso celular

$G_1$  - Fase de crescimento

$G_2$  – Fase de preparação da divisão celular

GC – Grupo Controle

GE – Grupo de Estudo

$\text{H}^+$  - Hidrogênio

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

HUVEC - Células endoteliais da veia umbilical humana

Kg – Quilo gramas

M - Mitose

MDA - Malondialdeído

mg – Miligramas

ml – Mililitros

mM – Milimolar

ng – Nanograma

nM – Nanomolar

Nº - Número

° C – Graus Celsius

O<sub>2</sub> - Oxigênio

pg – Pico gramas

RL – Radicais Livres

RLO – Radicais Livres de Oxigênio

RPM – Rotações por minutos

S – fase de síntese de proteína

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

U – Unidade

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VBC – Verde de Bromocresol

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Alterações no protocolo de recuperação dos hepatócitos	<b>25</b>
TABELA 2: Alterações realizadas no protocolo de cultivo celular	<b>28</b>
TABELA 3: Dados comparativos de todas as dissociações, para os dois grupos controle e estudo	<b>34</b>
TABELA 4: Resultados de albumina, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular	<b>35</b>
TABELA 5: Resultados de albumina, comparando-se os grupos X dia de cultivo celular	<b>36</b>
TABELA 6: Resultados de MDA, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular	<b>36</b>
TABELA 7: Resultados de MDA, comparando-se os grupos X dia de cultivo. Celular	<b>38</b>

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Fórmula estrutural do alopurinol	<b>11</b>
FIGURA 2 – Figura esquemática com tipos de cultivos celulares	<b>15</b>
FIGURA 3 – Delineamento da amostra	<b>19</b>
FIGURA 4 - Aplicação do medicamento alopurinol – intramuscular	<b>20</b>
FIGURA 5 – Cateterização da veia porta	<b>21</b>
FIGURA 6 – Dissociação enzimática	<b>22</b>
FIGURA 7 – Teste de exclusão pelo azul de trypan	<b>26</b>
FIGURA 8 - Coloração por fluorescência	<b>26</b>
FIGURA 9 – Dosagem de albumina – Método colorimétrico	<b>29</b>
FIGURA 10 – Dosagem de MDA – Método colorimétrico	<b>30</b>
FIGURA 11 – Curva de calibração MDA	<b>31</b>
FIGURA 12. Cultivo dos hepatócitos (grupo de estudo) 22/04/2006	<b>32</b>
FIGURA 13. Cultivo dos hepatócitos (grupo Controle) 22/04/2006	<b>33</b>
FIGURA 14 - Gráfico de comparação dos valores de albumina entre os dois grupos (controle e estudo)	<b>35</b>
FIGURA 15 - Gráfico de comparação dos valores de MDA entre os dois grupos (controle e estudo)	<b>37</b>

## RESUMO

**Introdução:** A falta de órgãos é um problema em todo o mundo, o uso de hepatócitos isolados poderá ser a solução para este problema. Resta determinar o comportamento dos hepatócitos *in vitro*. Os radicais livres, que contribuem para o dano celular, pois tem envolvimento direto com os mecanismos relacionados na lesão e morte celular, poderiam ser um dos fatores impeditivos para utilização dessa prática. **Objetivo:** A proposta do trabalho é de observar o efeito protetor do alopurinol nos hepatócitos em cultura, pelo seu efeito inibidor da xantina oxidase na geração de radicais livres de oxigênio e determinar a melhor técnica para a dissociação e o cultivo primário dos hepatócitos. **Método:** Os hepatócitos foram isolados, a partir de fígado de ratos, pela dissociação enzimática segundo a técnica descrita por Berry e Friends em 1969 e modificada por Seglen *et al* em 1976. As técnicas cirúrgicas foram realizadas na sala de cirurgia experimental da PUC/PR. Foram realizadas contagens iniciais e calculada a viabilidade pelo teste de exclusão pelo azul de trypan. As concentrações de albumina e de malondialdeído foram analisadas por testes bioquímicos colorimétricos. **Resultados:** O rendimento dos hepatócitos isolados após a digestão enzimática, utilizando-se colagenase, foi de  $1,5 \times 10^6$  cel/gr/fígado para o GC e  $1,7 \times 10^6$  cel/gr/ fígado para o GE, com viabilidade inicial de 60% para ambos os grupos. O resultado para albumina foi de 0,1868 mg/ml (+/- 0,023) para o GC e 0,1384 mg/ml (+/- 0,019) para o GE. Para o MDA os resultados fora 0,3963 nmol/mg de proteínas (+/-0,098) para o GC e 0,2040 nmol/mg de proteínas (+/- 0,058) para o GE. **Conclusões:** O alopurinol diminui a produção do MDA, demonstrando um menor estresse oxidativo nas células tratadas previamente com o medicamento. Porém essa diminuição não chega a interferir na manutenção da viabilidade celular. Pelos resultados alcançados no trabalho, sugere-se que a melhor técnica para dissociação de hepatócitos é a descrita por Berry e Seglen. Propõe-se, ainda, como melhor meio de cultivo o rico em suplementos, como insulina, fator de crescimento e heparina. Quanto mais rico o meio de cultura, melhor a aderência dos hepatócitos.

**Palavras-chave:** hepatócitos; transplantes, radicais livres de oxigênio.

## ABSTRACT

**Background:** The lack of organs is a serious problem all over the world. The use of isolated hepatocytes could be indicated in some specific cases replacing whole organ liver transplant. One of the most important steps before its application is to determine the hepatic cells behavior *in vitro*. Free radicals are directly associated with death and damage to cells and they are still one of the main obstacles to the widespread use of this kind of procedure. **Aims:** To observe the protective effect of allopurinol on cultured hepatic cells as an inhibiting agent of xanthine oxydase production of oxygen-free radicals, and to determine the best technique for the dissociation and primary culture of hepatocytes. **Method:** The hepatocytes were isolated by enzymatic dissociation accordingly to the technique described by Berry and Friends in 1969 and modified by Seglen in 1976. The surgical procedures were performed at the experimental laboratory at PUC/PR. Cell counting as well as viability were determined by Trypan Blue. The production of albumin and malondialdeido (MDA) were analysed by biochemical and colorimetric tests. **Results:** The number of isolated hepatocytes after the enzymatic digestion was in average  $1.5 \times 10^6$  cel/gr of liver (control group) and of  $1.7 \times 10^6$  cel/gr of liver (study group) and with initial viability of 60% for both the groups. The result for albumin was of 0.1868 mg/ml (+/- 0.023) for CG and 0,1384 mg /ml (+/- 0.019) for SG. The results for MDA were 0.3963 Nmol/mg of proteins (+/- 0.098) for GC and 0,2040 Nmol/mg of proteins (+/- 0.058) for SG. **Conclusion:** The allopurinol reduces MDA, showing reduced oxygenic stress on the SG cells. However, this reduction did not interfere in cellular viability. For the results reached in the work, one suggests that the best technique, for dissociation of hepatocytes is the described one for Berry and Seglen. It is suggested as good half of culture, for the growth of these cells is the rich one in supplements, as the insulin, factor of growth and heparin, the more rich the way of culture, better the tack them hepatocytes.

**Key Words:** hepatic cells, transplants, oxygen-free radicals

## INTRODUÇÃO

O transplante de fígado é usado na terapêutica do estágio terminal de doenças crônicas, nas hepatites fulminantes ou nos erros inatos de metabolismos (BALLADUR, CREMA *et al.*, 1995; STROM, CHOWDHURY *et al.*, 1999) grandes inconvenientes da técnica são: mortalidade significativa, alta taxa de morbidade, períodos longos de internamento, dose elevada de imunossupressores, falta de doadores e o alto custo do procedimento (NICOLUZZI, REPKA *et al.*, 2004).

Atualmente o isolamento de hepatócitos para transplante isolado como recurso para suprir a insuficiência hepática é, em certos casos, alternativa ao transplante de fígado inteiro. Principalmente em casos de hepatite fulminante, a assistência hepática através da reposição de hepatócitos isolados poderia dar tempo à regeneração ou mesmo, tempo de se obter um órgão de qualidade, funcionando neste caso como “ponte”, até a obtenção de um órgão adequado (NORDLINGER, MARIANI *et al.*, 1994; STROM, CHOWDHURY *et al.*, 1999).

Porém uma questão importante é a determinação do número de hepatócitos necessários para ser transplantado. Provavelmente cada doença ou cada paciente, necessite de um número específico de células. Para atingir maior quantidade de células seria necessária a realização de vários transplantes, (YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002) ou então recorrer ao cultivo primário dos hepatócitos para aumentar o número de células a serem transplantadas.

O cultivo de hepatócitos vem sendo estudado de maneira sistemática em modelos experimentais há quase três décadas e, apesar dos esforços, ainda não foi encontrado um meio de cultivo ideal (XIAO-LI, LAN-JUAN *et al.*, 2002).

Porém antes de se pensar em uma futura aplicação clínica, precisa-se determinar o comportamento dos hepatócitos *in vitro*, determinar o quanto essas células podem sobreviver e preservar suas funções, após a dissociação e cultivo (SEN e JALAN, 2005). Um dos principais fatores que poderia interferir na sobrevivência destas células, *in vitro*, são os radicais livres que, contribuem para o dano celular, pois tem envolvimento direto com os mecanismos relacionados na lesão e morte celular (RHODEN, MAURI *et al.*, 1999).

O objetivo principal deste estudo é o de avaliar o efeito protetor do alopurinol, nos hepatócitos em cultura, pelo seu efeito inibidor da xantina oxidase na geração de radicais livres de oxigênio.

A partir das práticas de dissociação e cultivo, estabelecer a melhor técnica de dissociação e o melhor meio de cultivo celular para hepatócitos de ratos.

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 O FÍGADO

O fígado é o maior órgão do corpo humano, pesa em média 1,5 quilos e localiza-se no lado direito da cavidade abdominal. Juntamente com o baço e a medula óssea são os responsáveis pela hematopoiese, formação e desenvolvimento das células sanguíneas. Além de participar intensamente de todo o metabolismo, como nos processos de digestão, armazenamento de vitaminas, estocagem de energia e produção de fatores necessários à coagulação do sangue entre outros. Para realizar suas múltiplas funções requer aporte sanguíneo elevado (OLIVEIRA, 2000). Além de ser um dos órgãos mais importantes do corpo é também um dos mais complexos, uma vez que ainda não existem remédios capazes de reavivar as funções de um órgão que já entrou em falência.

O progresso dos transplantes hepáticos tornou clara a existência de dois problemas: primeiro o crescente número de pacientes em espera nas listas; segundo como aumentar o número de órgãos disponíveis para transplante.

Atualmente as melhores maneiras para solucionar esses problemas seriam: a utilização da técnica do *split liver* e a divisão do fígado para dois receptores e o transplante com doador vivo (KALIL, 1997).

## 1.2 HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES

Os relatos de tentativas de transplantes datam do ano de 384 d.C., onde a lenda conta que Cosme e Damião realizaram um transplante da perna de um soldado mouro em um idoso (PEREIRA, 1996).

O termo transplante foi utilizado pela primeira vez por John Hunter em 1778. No ano de 1950 iniciou-se uma série de transplantes renais humanos em Paris e Boston, porém, a média de vida era muito curta, pois não havia o uso de imunossupressores. Em 1954 foi realizado o primeiro transplante renal entre irmãos gêmeos idênticos, com memorável sucesso. Em 1960 Lower e Shumuay iniciaram os estudos para o transplante cardíaco clínico. Também em 1960 foram desenvolvidas as técnicas cirúrgicas para o transplante de fígado, com resultados muito pobres, esses resultados precários fizeram com que os centros de transplantes desistissem inicialmente desta técnica (para revisão vide (YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002).

Na década de 80 a ciclosporina revolucionou os transplantes clínicos em todas as áreas, assim como também foram padronizadas as retiradas de múltiplos órgãos (PEREIRA, 1996; CASTRO, CASTRO *et al.*, 2002) O desenvolvimento e o refinamento da técnica de transplante hepático permitiram que no ano de 1983, a Organização Mundial da Saúde reconhecesse o transplante de fígado como terapia efetiva para os problemas hepáticos. Este tipo de transplante apresentou grande melhora em seus resultados, apresentando hoje 85% a 90% de sobrevida em um ano de transplante (MIES, 1998; YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002). A descoberta de métodos eficazes de conservação e a melhor compreensão dos fenômenos

imunológicos contribuíram significativamente para o aumento da sobrevida (CASTRO, CASTRO *et al.*, 2002).

Entretanto, o transplante de fígado ainda é um procedimento arriscado (SETTE, BACCHELLA *et al.*, 2003), pois nenhum outro órgão interfere em tantas funções (MIES, 1998) e é ainda o que apresenta substancial morbidade e mortalidade (YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002), sendo a rejeição a causa mais comum de óbito após seis meses de transplante (COELHO, PAROLIN *et al.*, 2003), apesar do advento dos imunossupressores e melhores condições das unidades de terapia intensiva (YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002). A carência de órgãos é outro fator limitante, (SETTE, BACCHELLA *et al.*, 2003) estima-se que cerca de 2.200 pessoas, nos EUA, morrem nas filas aguardando por um órgão .

Da análise destes dados conclui-se que eram necessárias pesquisas alternativas que pudessem oferecer suporte metabólico temporário ou definitivo, a fim de manter os doentes hepáticos vivos e em melhores condições, até que consigam um órgão para transplante (HENGSTLER, BRULPORT *et al.*, 2005).

O xenotransplante, denominação dada ao transplante de órgãos entre espécies diferentes, é uma opção alternativa para reduzir a escassez de órgãos e tecidos humanos. Com o objetivo de trazer esperanças às pessoas que não possam contar com técnicas tradicionais de cura. Porém o transplante bem sucedido de órgão inteiro de animais geneticamente manipulados, no ser humano está se tornando cada vez menos provável, o enorme problema com a rejeição ainda não foi contornado e os altos custos do procedimento praticamente inviabilizam o seu uso. Essa técnica pode ser cientificamente

justificável (SEN e JALAN, 2005), porém existem enormes problemas médicos, éticos, sociais e legais que precisam ser resolvidos antes do prosseguimento das experiências. Neste contexto surgem novas descobertas para suprir o transplante de fígado inteiro. O transplante de hepatócitos vem sendo estudado há quatro décadas, porém apenas recentemente começaram a apresentar seus primeiros resultados clínicos (MAZARIS, ROUSSOS *et al.*, 2005).

### 1.3 TRANSPLANTE DE HEPATÓCITOS

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial, altamente diferenciada, que raramente se divide. Apenas um hepatócito entre 20.000 pode estar em processo de divisão em algum momento, durante a vida do ser humano ou animal, essa divisão ocorre apenas uma ou duas vezes para cada célula (JESUS, WAITZENBERG *et al.*, 2000).

Desde a metade do século passado as pesquisas de isolamento de células hepáticas vêm sendo realizadas (GERLACH, 1995). A vantagem em se utilizar hepatócitos é que os mesmos podem ser obtidos a partir de segmentos hepáticos de fígados normais, assim como de órgãos captados, porém inadequados para o transplante, podendo também ser criopreservados (MAZARIS, ROUSSOS *et al.*, 2005).

O transplante de hepatócitos surge também como meio alternativo mais simples menos evasivo e mais barato (SORIANO, WOOD *et al.*, 1997), podendo funcionar temporariamente substituindo as funções do fígado nativo, servindo assim como ponte para o transplante ou até permitindo a regeneração do órgão nos casos de insuficiência hepática fulminante (YAMAKAMI,

CARAVATTO *et al.*, 2002). Atualmente o isolamento e o cultivo de hepatócitos para transplantes isolados como recurso para suprir insuficiência hepática poderia ser, em certos casos, alternativa ao transplante com fígado inteiro (NICOLUZZI, REPKA *et al.*, 2004).

#### 1.4 RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

Os estudos mais antigos sobre os radicais livres de oxigênio (RLO) baseavam-se no papel que eles exercem na presença de toxinas ou antígenos. (KEHRER, PIPER *et al.*, 1987; RAMON, 1993; LOPES, JURISICOVA *et al.*, 1997; MATES, 2000; SCHANAIDER, 2000). A ação dos RLO nunca é isolada, e depende da amplitude da resposta do sistema imunológico e das interações entre os mecanismos que regulam a ativação de reações inflamatórias (SCHANAIDER, 2000). Estes compostos participam também da desinfecção dos microssomos, na fagocitose, na formação de prostaglandinas e neurotransmissores (KEHRER, PIPER *et al.*, 1987; RAMON, 1993; LOPES, JURISICOVA *et al.*, 1997; MATES, 2000). Estudos recentes demonstram que esses agentes oxidantes atuam em múltiplos processos orgânicos e que seus efeitos, às vezes benéficos, também podem ser em outras situações maléficas (SCHANAIDER, 2000).

Radical livre (RL) é qualquer molécula ou átomo que exista independente de outros átomos ou moléculas (RHODEN, PEREIRA-LIMA *et al.*, 2000) e tenha em sua última camada um ou mais elétrons desemparelhados. Esses elétrons desemparelhados ocupam um orbital atômico ou molecular isoladamente (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004), e

conferem ao radical enorme reatividade química que lhe conduzirá a interagir com outros radicais ou com uma espécie química estável (RAMON, 1993). Isso pode ocorrer de três maneiras:

- O radical pode ceder o seu elétron desemparelhado sendo assim um radical redutor.
- O radical pode tomar um átomo da molécula estável para emparelhar com o seu elétron sendo assim um radical oxidante.
- O radical pode unir-se à molécula estável.

Em qualquer um desses casos surgirá um outro radical quimicamente agressivo. Toda oxidação implica em uma redução, pois um átomo cede elétrons e outro capta então o correto é falar de reação de óxido-redução (CRYSTAL e RAMON, 1992). A grande maioria dos RLO possui meia vida muito curta, indo de segundos a nano segundos, sendo capaz de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos, como as membranas celulares (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004).

Em condições normais as células podem metabolizar a maior parte do O<sub>2</sub> com água (cerca de 95%), sem que haja a formação de intermediários tóxicos pela via de redução tetravalente, ou seja, uma molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>) + 4 moléculas de hidrogênio (H<sup>+</sup>) que irão formar duas moléculas de água (2H<sub>2</sub>O), porém uma pequena percentagem (cerca de 5%) o faz mediante a redução univalente. Neste caso, uma molécula de oxigênio mais quatro elétrons e quatro prótons formam duas moléculas de água e mais três intermediários altamente tóxicos, dois dos quais são radicais livres: um ânion superóxido e uma hidroxila, o terceiro produto é o peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (RAMON, 1993). Em condições normais estas espécies reativas são produzidas e utilizadas em compartimentos como os lisossomos que se encontram no interior dos fagócitos, e não causam danos à célula (CRYSTAL e RAMON, 1992). Os RL passam a ter um efeito prejudicial ao nosso organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou diminuição de agentes oxidantes. Em qualquer dessas situações começa a predominar um excesso de RL no organismo, que irá deflagrar uma reação em cadeia, lesando seriamente várias estruturas celulares (CABRERA e SERRANO, 2000). Esse acúmulo de espécies reativas ao oxigênio que culmina com a lesão celular é denominado estresse oxidativo (SANCHEZ-RODRIGUEZ, SANTIAGO-OSORIO *et al.*, 2004).

A recuperação de um órgão, após episódio isquêmico, requer re perfusão sanguínea, porém este mecanismo pode determinar piora da lesão no tecido que sofreu isquemia, pois a oferta excessiva de oxigênio aumenta a produção de RL. A enzima xantina oxidase é a intermediária mais importante na gênese dos RL em tecidos que sofreram isquemia (RHODEN, MAURI *et al.*, 1998), porque é uma importante fonte de radicais livres em tecidos reperfundidos. Durante a isquemia, a xantina oxidase produzida pela conversão da xantina desidrogenase acumula-se nos tecidos, a velocidade dessa conversão é diferente para os diferentes tecidos (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004). O nível de cálcio livre se eleva em decorrência do processo isquêmico, favorecendo a produção de xantina oxidase, a partir da xantina desidrogenase, e há o acúmulo de hipoxantina nos tecidos (LEITE e SARNI, 2003). O aumento subsequente da oferta de oxigênio, que ocorre na re perfusão, promove a conversão da hipoxantina em xantina e geração de grande quantidade de

radicais superóxido. Em conseqüência, desencadeia-se uma cascata de RL. O principal efeito dos radicais livres é a peroxidação dos lipídios. As membranas celulares são compostas de fosfolipídios e ácidos graxos insaturados. Os RLO causam lesão celular por induzir peroxidação desses lipídios (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004).

Uma das primeiras estratégias adaptativas foi a de utilizar o O<sub>2</sub> como receptor de elétrons na cadeia respiratória, o que gera simplesmente água, uma substância não tóxica (PÉREZ, 2000). O oxigênio podia ser empregado em outros processos bioquímicos como a síntese de hormônios, neurotransmissores e o catabolismo de substâncias tóxicas (CRYSTAL e RAMON, 1992). Porém as células também desenvolveram mecanismos adaptativos que as protegem dos efeitos prejudiciais dos oxidantes. Na natureza os organismos são dotados de metabolismo aeróbio com múltiplos sistemas de desintoxicação ou antioxidante (SCHANAIDER, 2000; CASTILLO, BENEDITO *et al.*, 2001; GUERRA, 2001).

Um antioxidante é qualquer substância capaz de atenuar os efeitos de oxidação de uma substância oxidante (ZHANG, ZHENG *et al.*, 2004). Seriam equivalentes a uma substância tampão, que pode captar ou liberar heterogêneos e que tem por tanto uma ação reguladora sobre as trocas de pH (SIES, 1997; DUTHIE, 1999).

## 1.5 ALOPURINOL

O alopurinol é um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico e inibidor da xantina oxidase geradora do RL, pois se trata de

uma molécula sintética semelhante à hipoxantina (FIGURA 1) (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004).

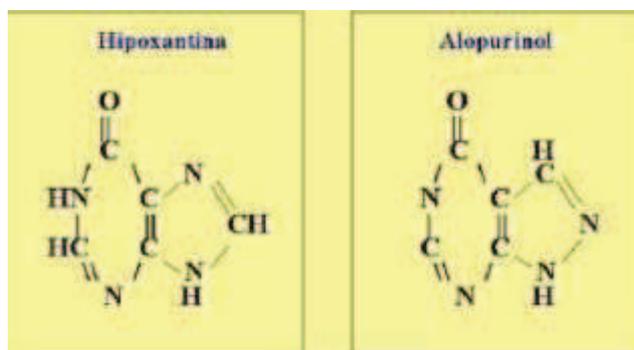


FIGURA 1. Fórmula estrutural do alopurinol: demonstrando a semelhança desta molécula sintética com a hipoxantina.

O alopurinol e seu metabólito principal a aloxantina (oxipurinol), são inibidores da xantina-oxidase. A inibição dessa enzima é responsável pelos principais efeitos farmacológicos do alopurinol. Durante a re perfusão há um aumento da produção de radicais livres provocado pela ativação das células de Kupffer e de neutrófilos, ação da xantina oxidase, conversão de adenosina em xantina e hipoxantina, e conversão de óxido nítrico a peroxinitrito (MIRANDA, VIARO *et al.*, 2004). Antioxidantes endógenos resistem aos danos provocados pelos radicais livres. Em modelos animais, sua utilização tem demonstrado efeitos positivos em fenômenos de isquemia de re perfusão. A principal ação proposta para os efeitos benéficos do alopurinol seria a de que inibindo a enzima xantina oxidase, que catalisa de modo irreversível a transformação da hipoxantina, proveniente do catabolismo de compostos energéticos de purina tais como o ATP, ADP, AMP, em xantina. Portanto, interrompendo essa rota de degradação, restabelecendo assim, pelo menos em parte, o nível energético para a manutenção dos eventos metabólicos que se processam em nível celular (RHODEN, MAURI *et al.*, 1999).

O alopurinol é rapidamente absorvido pelo organismo e seu pico de concentração ocorre após 60 minutos da administração (BORGES, FERNANDES *et al.*, 2002).

## 1.6 DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA

Nas primeiras pesquisas, nos anos 50 foram utilizados processos não enzimáticos para o isolamento desses hepatócitos, com o uso de ácido-etileno-diamino-tetraacético (EDTA), mas o método mostrou-se ineficiente e desestimulou a continuidade das pesquisas (DEMETRIOU, REISNER *et al.*, 1988). Em 1967 foi introduzido por Howard e col., o método enzimático para separação dos hepatócitos (HEWITT, CORNO *et al.*, 1997). Esse método foi aperfeiçoado por Berry e Friends em 1969 e posteriormente, e modificado por Seglen em 1976, trazendo novas perspectivas aos pesquisadores (BERNUAU, RUEFF *et al.*, 1986). A introdução da colagenase, como meio de perfusão diretamente no parênquima através da punção mostrou eficácia de 70% no isolamento dos hepatócitos quando utilizados fragmentos pequenos. Em fragmentos maiores o método se mostrou ineficaz. Em 1982 STROM e col. propuseram infundir a colagenase através da cateterização dos ramos portais, dessa maneira obtiveram um grande número de hepatócitos ( $50 \times 10^6$ /gr de tecido) com viabilidade de 70%. Mais tarde as perfusões das soluções enzimáticas foram realizadas através da veia porta, obtendo como resultado grandes massas hepatocitárias (MITO, EBATA *et al.*, 1979).

Essa técnica foi testada primeiramente em ratos adultos, e o sucesso foi expandido para várias espécies. Devido ao tamanho do fígado dos primatas a

técnica não teve igual êxito nesses animais (GUGUEN-GUILLOUZO, CAMPION *et al.*, 1982).

Apesar dos esforços para encontrar a melhor técnica para a obtenção de hepatócitos viáveis, ainda não houve consenso e tão pouco a padronização do método (YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002).

## 1.7 CULTIVO CELULAR

O cultivo celular se desenvolveu a partir dos estudos de embriologia. Em 1805 Roux manteve células de embriões em solução salina durante alguns dias. Porém o zoólogo americano R. G. Harrison é considerado o pai do cultivo celular de tecidos animais. Harrison foi o primeiro a empregar técnicas *in vitro* para os estudos de fenômenos *in vivo* em 1907 (REINA, 2006).

Atualmente se entende por cultivo celular o conjunto de técnicas que permitem manter as células *in vitro* com o máximo de propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas (REINA, 2006). Dependendo das características de cada população celular será empregado um tipo diferente de cultivo. Uma característica do cultivo de células animais é a necessidade de duas fontes de carbono: a glicose e a glutamina. No metabolismo destas duas fontes de carbono, praticamente toda a glicose é convertida em lactato e toda glutamina em amônio (VRIEZEN, ROMEIN *et al.*, 1997).

O cultivo celular tem uma série de vantagens inegáveis:

- Controle preciso do meio ambiente: em cultivo pode-se controlar todos os fatores que podem interferir nos resultados, como: níveis de O<sub>2</sub> e

CO<sub>2</sub>, tensão superficial, pressão osmótica, hormônios, fatores de crescimento, etc.

- Caracterização e homogeneidade das amostras: as células de cultivo derivam de uma linhagem celular homogênea, com morfologia e composição uniformes. Podem se obter essas linhagens com facilidade em alto número, com o qual se supera os problemas de heterogeneidade nas amostras de espécies vivas.
- Economia: os volumes de reagentes e drogas são menores quando se trabalha com células.
- Ética: a pesquisa biomédica supõe a eutanásia, a cada ano, de milhões de animais em experimentos. Com o emprego de cultivo celular o estudo pode acontecer com a eutanásia de poucos indivíduos, pois cada animal gera milhões de células para estudo.

Quanto às desvantagens temos:

- Técnica sensível: o crescimento das células animais é muito mais lento do que de outros organismos, além do que organismos pluricelulares são incapazes de crescer na ausência de uma mistura de nutrientes. Exige ainda uma assepsia do técnico que vai realizar os instrumentos.
- Quantidade X Custo: muitas vezes o custo de produção de 1g de tecido cultivado é 10 vezes maior do que se obtido de um animal. E ainda para produção acima de 100 g a necessidade de instalações industrial.
- Instabilidade: muitas linhagens celulares são instáveis, podendo variar suas sub populações (REINA, 2006).

Podemos citar três tipos de cultivo: o cultivo de órgãos, explantes primários e cultivo celular (FIGURA 2).



FIGURA2: Esquema dos tipos de cultivos celulares (REINA, 2006 adaptado de Freshney, 2000).

O cultivo de órgãos implica em manter a característica do tecido *in vivo*, pelo menos em parte. Esse tipo de cultivo permite manter os tipos celulares diferenciados e é uma replica do tecido de origem mantendo a estrutura tridimensional. No explante primário os fragmentos e tecidos ou de órgãos se aderem a uma superfície a onde ocorre à proliferação das células periféricas do explante. Por fim o cultivo celular que consiste na dissociação celular por meios

enzimáticos ou mecânicos. A suspensão celular pode ser cultivada em superfície aderente ou em meios de cultivo. Esse tipo de cultivo permite uma propagação rápida e o aumento da massa celular ao longo das gerações. Como desvantagens têm a perda da heterogeneidade celular do início do cultivo (TONSO, 2000).

Atualmente o cultivo celular é o mais empregado, principalmente pela possibilidade de propagação, assim como pelas vantagens de quantificação, caracterização e reprodutibilidade dos experimentos. Para compensar a ausência de interações celulares, estão sendo realizadas há alguns anos o cultivo misto, com grande êxito (REINA, 2006).

As células dos organismos inferiores e superiores apresentam características diferentes e muito relevantes, enquanto as células de organismos inferiores estão adaptadas ao crescimento independente, as células dos organismos superiores encontram-se diferenciadas, cada uma com uma função específica. Por isso há entre as células dos organismos superiores, uma dependência, que gera como consequência uma série de limitações (REINA, 2006).

## 1.8 – CULTIVO DE HEPATÓCITOS

A cultura primária de hepatócitos vem sendo desenvolvida a aproximadamente 20 – 30 anos, porém ainda não se chegou a um meio de cultura aceito por todos, como padrão para essa célula (XIAO-LI, LAN-JUAN *et al.*, 2002). Apesar do grande número de estudos, ainda não é possível expandir satisfatoriamente pequenas quantidades de hepatócitos em um

período de tempo suficientemente curto (STROM, CHOWDHURY *et al.*, 1999; YAMAKAMI, CARAVATTO *et al.*, 2002). Uma tentativa seria padronizar o cultivo primário destas células. Segundo Nicoluzzi é possível a utilização de linhagens hepatocitárias, que podem crescer rapidamente em cultura e permitem obtenção de boa qualidade de massa celular (NICOLUZZI, BARBU *et al.*, 2000). Porém essas células modificadas expõem os pacientes ao risco de câncer, sendo, portanto recomendadas para utilização em circuitos extra corpóreo ou sob a forma encapsulada como transplante isolado (SUSSMAN, COHONG *et al.*, 1992). Em cultura convencional os hepatócitos perdem muito rapidamente suas funções metabólicas, o modelo de co-cultura poderia solucionar esse problema (HENKENS, VANHAECKE *et al.*, 2006) onde células epiteliais, pancreáticas ou qualquer outro tipo de célula, ajudariam na adesão dos hepatócitos ao substrato e manteriam suas funções por períodos maiores (LANGE, BRUNS *et al.*, 2006).

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1 - ANIMAIS

Foram utilizados durante todo o trabalho, como doadores de hepatócitos, 18 ratos (*Rattus Norvegicus norvegicus*, Wistar), machos, com 235 +/-29 gramas, criados em condições determinadas pelo COBEA, pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade sob o Parecer N°. 21/04/ CEPA-PUCPR. Os animais foram separados em dois grupos:

- Grupo 1 – Grupo Controle: GC – sem tratamento com Alopurinol (N total=9)
- Grupo 2 – Grupo de Estudo: GE – com tratamento com Alopurinol (N total=9)

#### 2.1.1 Delineamento da amostra

Nas duas primeiras práticas foram utilizados dois ratos por grupo, depois a cada prática foi utilizado um animal por grupo (total de 18 animais). De cada animal foram retiradas células hepáticas para estudo (FIGURA 3).

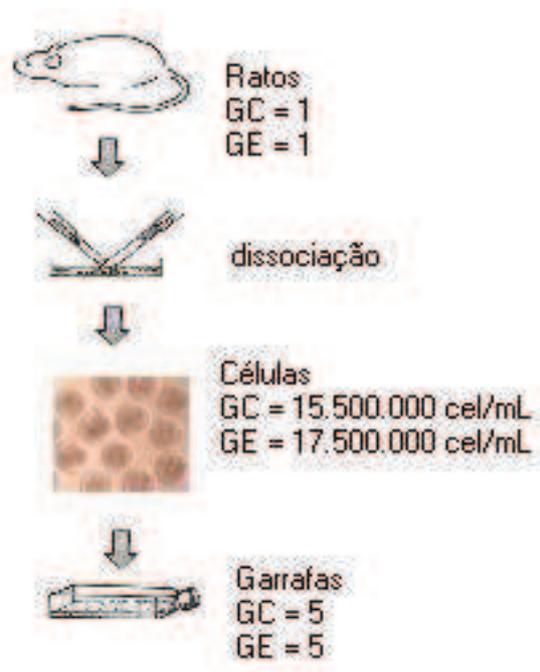


FIGURA 3: Esquema do delineamento da amostra, para cada prática isoladamente.

Para iniciar o cultivo celular era necessária uma quantidade mínima de  $1,5 \times 10^6$  hepatócitos por ml (XIAO-LI, LAN-JUAN *et al.*, 2002) viabilidade inicial próxima de 60% (ZHENG, OHKONCH *et al.*, 2005). Para que as provas bioquímicas fossem realizadas essas células teriam que permanecer no mínimo cinco dias aderidas à placa (CREMA e GONÇALVES, 1998). Somente as práticas que preencheram esses requisitos foram consideradas para a discussão e conclusão do trabalho.

## 2.2 – PREPARO DOS ANIMAIS

Os animais do GE foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% + xilasina via intramuscular, pela panturrilha, após a indução anestésica os animais foram tratados com medicamento alopurinol (Zyloric® 100 mg). O medicamento foi preparado em solução fisiológica – 1 comprimido 100 mg para

20 ml de solução fisiológica (RHODEN, MAURI *et al.*, 1999). Cada animal recebeu uma dose de 1ml/quilo/rato, (1,175 ml por animal) por via intramuscular (MOLINA, MANESCHI *et al.*, 1993) (FIGURA 4), 1 hora antes da perfusão (RHODEN, MAURI *et al.*, 1999), para que o medicamento alcançasse seu pico sérico que ocorre 60 minutos após a administração da medicação (BORGES, FERNANDES *et al.*, 2002).



FIGURA 4: Aplicação do alopurinol - intramuscular.

Todos os animais, controle (sem medicação) e estudo foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% + xilasina como sedativo, analgésico e relaxante muscular, 4mg/kg via intramuscular (pela panturrilha); ketamina como anestésico geral 10mg/kg e heparina como anticoagulante 1ml/grama/rato.

Após a verificação da indução profunda anestésica, os animais foram submetidos à tricotomia ampla da pelagem abdominal e fixados em prancha cirúrgica e a seguir foram heparinizados (100U/kg), por via intramuscular para melhorar a perfusão da circulação hepática. Foi realizada a descontaminação com PVPI e feita a abertura mediana da parede abdominal. A seguir fez-se

uma incisão mediana ampla, localizou-se o fígado e foi realizada a dissecação e a cateterização da veia porta (FIGURA 5).



FIGURA 5. Cateterização da veia porta.

### 2.3 – DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA

As práticas realizadas nos dias 04/11/2004; 26/04/2005; 12/09/2005; 02/11/2005; 22/04/2006 e 03/07/2006 foram realizadas pela técnica de dissociação enzimática segundo descrita por Berry e col., em 1969 e modificada por Seglen e col., em 1976. As técnicas cirúrgicas foram realizadas na sala de cirurgia experimental da PUC/PR.

Após a localização do fígado, dissecação e cateterização da veia porta (FIGURA 5), o cateter foi conectado (CREMA e GONÇALVES, 1998) e foi realizada a lavagem do sangue contido neste órgão, utilizando 300 ml de solução de lavagem (NaCl 160,8 mm; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,7mm) a 37°C, em débito de 30ml/min durante 10 minutos.

Assim que a solução de lavagem penetrou no fígado, fez-se a secção da veia cava, para completa lavagem do órgão. A seguir foi utilizada a solução de

dissociação (NaCl 160,8 mm; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,7mm; Colagenase tipo II, Sigma® (0,05%)) a 37°C em débito de 15ml/min durante 10 minutos. A colagenase promove a lise das junções dos desmossomas e dos hemi desmossomas entre as células adjacentes e a matriz extracelular e o resultado é a completa desagregação do tecido (FIGURA 6), sem que haja ruptura das células (STRAIN, 1994).



FIGURA 6. Dissociação enzimática, a área esbranquiçada é o tecido dissociado.

Na prática do dia 10/04/2006, na tentativa de se conseguir hepatócitos se aderissem melhor ao substrato, foi utilizado um protocolo alternativo desenvolvido pela Boehringer Mannheim Corporation, utilizado para dissociação enzimática de roedores. Foram utilizados 30 ml/minuto durante 5 minutos de tampão de lavagem (8,3 g de cloreto de sódio, 0,5 g cloreto de potássio e 2,4 g de HEPES®). Assim que o tampão de lavagem penetrou no fígado, fez-se a secção da veia cava, para completa lavagem do órgão. A seguir foi utilizada a solução de dissociação, contendo em débito de 30ml/min durante 7 minutos (composição: 3,9g de cloreto de sódio, 0,5 cloreto de potássio, 24,0 HEPES®, 7,0 mg colagenase Sigma).

## 2.4 – RECUPERAÇÃO DOS HEPATÓCITOS

Ao final de cada perfusão (práticas dos dias 04/11/2004 e 26/04/2005), o fígado retirado era colocado em placa de petri estéril contendo meio de cultura Leibovitz L-15 (Cultilab®), pesado e encaminhado ao laboratório de cultivo celular PUC/PR, onde a cápsula de Glisson era removida, os lobos hepáticos eram cortados com tesoura em pedaços pequenos os hepatócitos foram separados por agitação moderada em agitador tipo vortex. A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril e lavada duas vezes através de centrifugação à 6000rpm por dois minutos, a seguir as células foram colocadas em ficoll hipaque 1077 (Amershan Biosciences) e centrifugadas 30 minutos a 2000rpm, para separação de células mortas e restos de tecidos, por diferença de gradiente. Uma última lavagem com meio Leibovitz L-15® foi realizada para a eliminação completa do ficoll hipaque, o pellet foi dissolvido em 10 ml de meio Leibovitz L.

Em todas as práticas realizadas pelo método descrito por Berry (1969) a viabilidade inicial e o número de células ficaram próximos dos descritos na literatura. Porém a aderência dessas células ao substrato não ocorria e para tentar corrigir este problema, foram feitas várias mudanças no protocolo inicial, com a finalidade de aumentar a viabilidade dessas células em cultura.

### 2.4.1 - Prática 12/09/2005:

- Diminuiu-se centrifugação inicial de 6000rpm para 2000rpm;
- Utilizou-se agitação manual lenta para a recuperação dos hepatócitos;

#### 2.4.2 - Prática 02/11/2005:

- Centrifugação inicial em 2000rpm e agitação manual lenta.
- Excluiu-se o ficoll hipaque.

#### 2.4.3 - Prática 22/04/2006 e 03/07/2006:

- Após a remoção da cápsula de Glisson os fragmentos dos hepatócitos foram colocados em banho-maria a 37°C.
- Mantiveram-se as centrifugações iniciais em 2000rpm e agitação manual lenta. Não foi utilizado o ficoll hipaque.

#### 2.4.4 – Prática 10/04/2006:

- Protocolo alternativo (Boehringer Mannheim Corporation).
- Após a remoção da cápsula de Glisson os fragmentos dos hepatócitos foram colocados em banho-maria a 37°C.
- Agitação manual lenta, a centrifugação inicial foi de 2000rpm por 5 minutos.
- Não foi utilizado o ficoll hipaque.

A TABELA 1 mostra resumidamente as alterações realizadas no protocolo de dissociação, acima descritos, na tentativa de melhorar a adesão dessas células ao substrato plástico.

TABELA 1 – Alterações realizadas no protocolo de recuperação dos hepatócitos, em cada prática para melhorar a aderência dessas células em cultivo.

DATA	CENTR. INICIAL Velocidade/tempo	AGITAÇÃO	FICOLL HIPAQUE	CENTR. FICOLL HIPAQUE Velocidade/tempo	CENTRIFUGAÇÃO Velocidade/tempo	BANHO MARIA 37° C
04/11/2004	6000 rpm/ 2 min	Moderada vortex	sim	2000 rpm/ 30min	2000 rpm/ 10min	não
26/04/2005	6000 rpm/ 2 min	Moderada vortex	sim	2000 rpm/ 30min	2000 rpm/ 10min	não
12/09/2005	2000rpm/ 10 min	Lenta manual	sim	2000 rpm/ 30min	2000 rpm/ 10min	não
02/11/2005	2000rpm/ 10 min	Lenta manual	não	-	2000 rpm/ 10min	não
10/04/2006	2000rpm/ 5 min	Lenta manual	não	-	2000 rpm/ 5min	sim
22/04/2006	2000rpm/ 10 min	Lenta manual	não	-	2000 rpm/ 10min	sim
03/07/2006	2000rpm/ 10 min	Lenta manual	não	-	2000 rpm/ 10min	sim

## 2.5 – ACERTO DE CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE

Ao término de cada prática a suspensão final era submetida à contagem total de hepatócitos, utilizando-se a câmara de Newbauer e microscópio óptico comum, e para verificação de viabilidade foram utilizados dois corantes. Primeiro o azul de trypan que penetra nas células mortas, através das membranas que perdem a seletividade, tornando-as azuis. As células vivas permanecem translúcidas, pois a membrana intacta não permite a entrada do corante (FIGURA 7). A viabilidade celular é calculada pela fórmula:  $N^{\circ}$  células coradas/ $N^{\circ}$  células totais X 100 = % viabilidade (BAYLISS e PAUL, 1996).

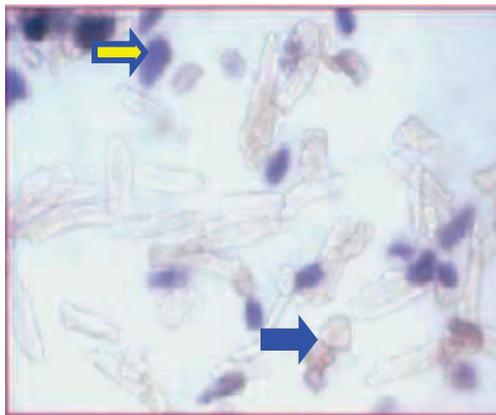


FIGURA 7. Figura ilustrativa do teste de exclusão pelo azul de trypan. A seta amarela mostra célula morta corada em azul. A seta azul mostra célula viva, translúcida (Aumento 20X).

Foi utilizado também o corante fluorescente FQAE100<sup>TM</sup> (One Lambda) que contém duas substâncias distintas: o brometo de etídio que cora as células mortas em vermelho e o acridine orange que cora as células vivas em verde (FIGURA 8).

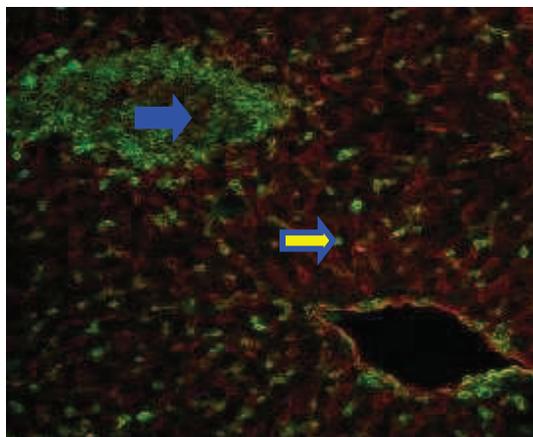


FIGURA 8. Figura ilustrativa do corante de fluorescência. A seta amarela mostra célula morta corada em vermelho. A seta azul mostra célula viva, corada em verde (Aumento 10X).

## 2.6 - CULTIVO CELULAR

Com a concentração celular e a viabilidade dentro dos valores descritos na literatura, foi realizado então o cultivo celular. Foram utilizadas, para cada grupo, cinco garrafas plásticas. Nas práticas dos dias 04/11/2004, 26/04/2005 e 12/09/2005, o meio de cultura utilizada era pobre, composto por cinco ml de meio Leibovitz L-15®, antibióticos (estreptomicina e penicilina 1%/100 ml), soro bovino fetal e aminoácidos (L-glutamina 2mM). As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO<sub>2</sub> (CREMA e GONÇALVES, 1998). A prática do dia 04/11/2004 não foi até o final, pois houve contaminação por fungos. Nas práticas realizadas em 26/04/2005 e 12/09/2005 não houve contaminação, mas também não houve aderência das células ao substrato.

Por esse motivo, foram realizadas, assim como no protocolo de dissociação, várias alterações, como suplementação do meio de cultura para se conseguir um melhor resultado no cultivo celular.

### 2.6.1 - Prática 02/11/2005:

- Acrescentou-se ao meio, 1UL de insulina bovina.

### 2.6.2 – Prática 10/04/2006:

- Acrescentou-se ao meio, 25ml de fator de crescimento (hipotálamo bovino).

### 2.6.3 - Práticas 22/04/2006 e 03/07/2006:

- Acrescentou-se ao meio 1UL de heparina.

Na prática realizada em 22/04/2006 com o número de células dentro do esperado, segundo a literatura e viabilidade inicial ideal, os hepatócitos mantiveram-se aderidos até o 5º dia de cultura. A cada vinte e quatro horas o meio de cultura era trocado e o sobrenadante armazenado para as dosagens bioquímicas. A TABELA 2 mostra como ficou a composição dos meios de cultura a cada tentativa de cultivo celular.

TABELA 2 – Mostra a composição do meio de cultura a cada prática de cultivo celular, com intuito de melhorar aderência das células em cultivo.

DATA	LEIBOVITZ	CÉLULAS	ANTIBIÓ TICOS	SBF 10%	AMINO ÁCIDOS	INSULINA BOVINA	FATOR DE CRESCIMENTO	HEPARINA SÓDICA
04/11/2004	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	-	-	-
26/04/2005	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	-	-	-
12/09/2005	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	-	-	-
02/11/2005	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	1UL	-	-
10/04/2006	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	1UL	25ml	-
22/04/2006	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	1UL	25ml	1UL
03/07/2006	4 ml	1 ml	1%/100ml	10%	2mM	1UL	25ml	1UL

## 2.7 – ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 2.7.1 - Albumina

A dosagem de albumina foi realizada pelo método colorimétrico do verde de bromo cresol (VBC), kit comercial Bioclin®, onde em presença da albumina, o VBC forma um complexo que exhibe espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre (FIGURA 9), permitindo assim a dosagem da albumina (Bioclin). Foram colocados 2,5 ml de sobrenadante do meio de cultura, em 2,5 ml do reagente de trabalho (verde de bromo cresol 1mmol/L +

tampão citrato 200mmol/L pH 3,6) a mistura ficou por 5 minutos em repouso e a leitura realizada em espectrofotômetro em 630 nm , o cálculo utilizado foi  $ALB = \text{Absorbância da amostra} / \text{absorbância do padrão} \times 3,8$ .

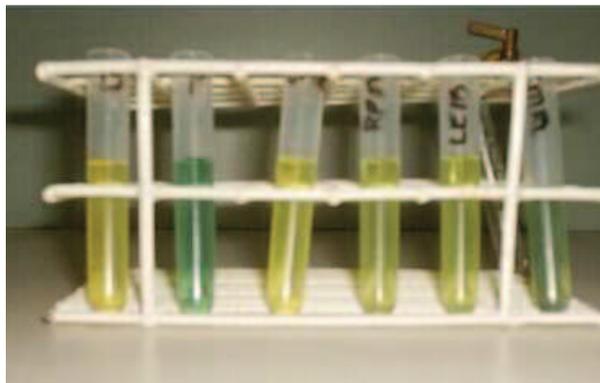


FIGURA 9: Foto ilustrativa da dosagem de albumina, método colorimétrico, coloração mais próxima ao verde indica presença de albumina na amostra.

#### 2.7.2 - Malondialdeído (MDA):

O MDA é um aldeído de três carbonos, produzido em sistemas lipídicos como resultado de processos de peroxidação lipídica, que reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo MDA + TBA que apresenta cor rosada (FIGURA 10), (PERCÁRIO, VITA *et al.*, 1994).

A dosagem do MDA foi realizada pelo método colorimétrico do TBA proposto por Khon e Liversedge em 1994, modificado por Percário, foram colocados 500ml de sobrenadante do meio de cultura, em 1000ml de ácido tiobarbitúrico. A mistura ficou em banho-maria à 95°C por 60 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente foram adicionados 4 ml de álcool n-butílico e centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm.

Após a centrifugação, 3 ml do sobrenadante foram utilizados para a leitura em espectrofotômetro em filtro 535 nm (PERCÁRIO, VITA *et al.*, 1994), os resultados foram analisados na curva de calibração.

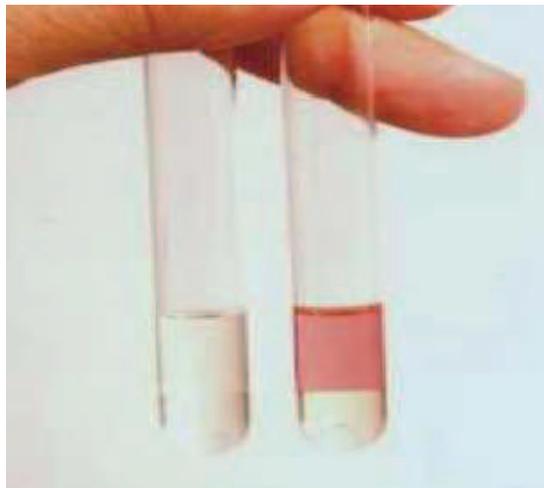


FIGURA 10: Foto ilustrativa da dosagem de MDA, método colorimétrico, mais quanto mais rosa a coloração maior a concentração de MDA na amostra (MARAIS & BLACHURST).

2.7.2.1 - Curva de Calibração: valores conhecidos de albumina foram lidos no espectrofotômetro em filtro 535nm, e colocados no gráfico cada valor de albumina (eixo Y) com seu resultado de absorbância (eixo X) (MAGALHÃES, 2005), traçou-se uma reta de calibração (FIGURA 11).

Para análise os resultados das amostras do sobrenadante, foram colocados no eixo X os valores encontrados no espectrofotômetro, e através da reta encontraram-se as concentrações de MDA, no eixo Y.

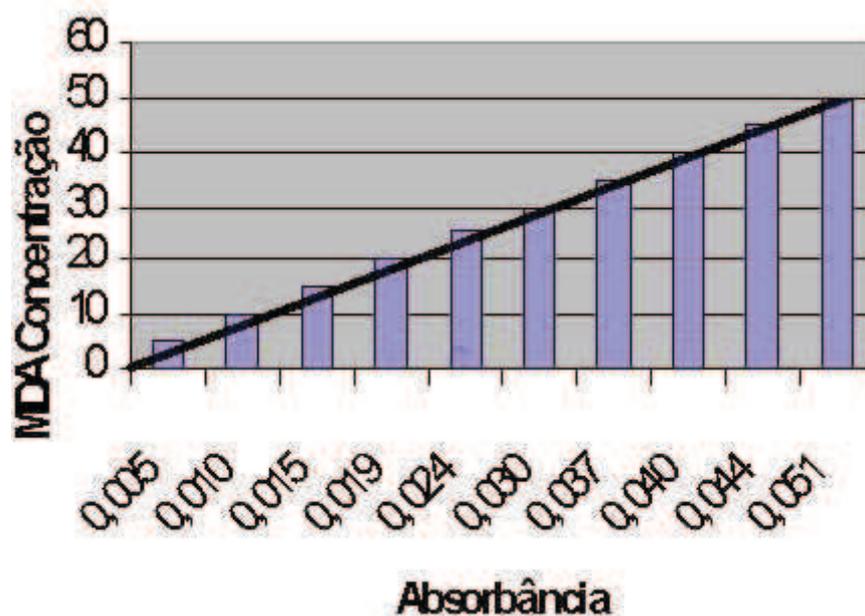


FIGURA 11. Curva de calibração de proteínas (Concentração do MDA em nmol/mg de proteínas).

## 2.8 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a análise dos resultados utilizou-se teste não-paramétrico de Mann-Whitney e o teste não-paramétrico de Wilcoxon, onde valores de  $p < 0,05$  indicam significância estatística.

### 3 – RESULTADOS

Os resultados analisados foram representativos da prática realizada em 22/04/2006, por ser a única que preencheu os requisitos mínimos necessários na dissociação. Rendimento celular de  $1,5 \times 10^6$  cel/gr/fígado (GC) e  $1,7 \times 10^6$  cel/gr/fígado (GE), e viabilidade celular inicial de 60% para os dois grupos, resultados estes compatíveis com a literatura, e cultivo celular foi mantido até o quinto dia, com células aderidas ao substrato. A FIGURA 12 (GC) e a FIGURA 13 (GE) mostram as células no primeiro e no quinto dia de cultura.

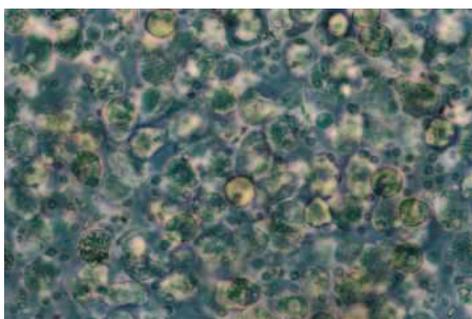


FOTO A

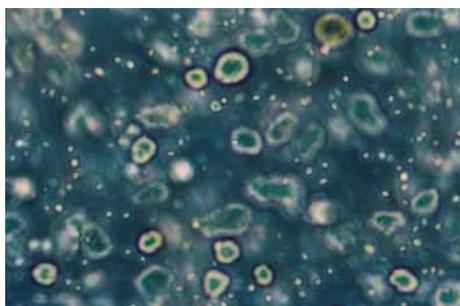


FOTO B

FIGURA 12. Grupo Controle - células em cultivo: primeiro (A), e quinto dia de cultivo celular (B). Prática de 22/04/2006, aumento 10X MO.

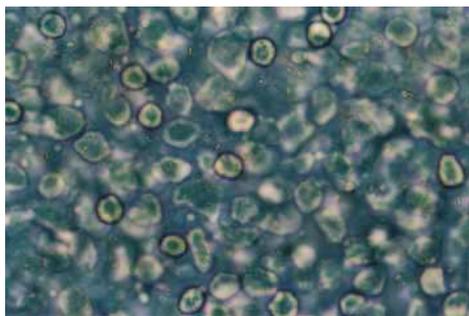


FOTO A

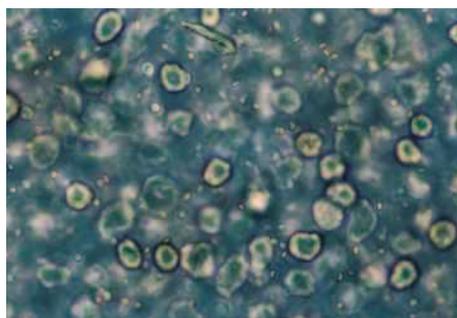


FOTO B

FIGURA 13. Grupo Estudo - células em cultivo: primeiro (A), e quinto dia de cultivo celular (B). Prática de 22/04/2006, aumento 10X MO.

Os resultados das demais dissociações estão na TABELA 3, pode-se observar que a práticas do dia 10/04/2006 foi a que obteve como resultado o menor rendimento celular e a pior viabilidade inicial.

TABELA 3: Dados comparativos de todas as dissociações, para os dois grupos: controle e estudo.

<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>04/11/2004</b>	<b>26/04/2005</b>	<b>12/09/2005</b>	<b>02/11/2005</b>	<b>10/04/2006</b>	<b>22/04/2006</b>	<b>03/07/2006</b>
FÍGADO (GAMAS)	15,950	15,280	14,740	15,900	13,510	9,970	15,499
Nº CÉLULAS/ ml	1,70 X10 <sup>6</sup>	2,85 X10 <sup>6</sup>	2,77 X10 <sup>6</sup>	2,20 X10 <sup>6</sup>	0,16 X10 <sup>6</sup>	1,55 X10 <sup>6</sup>	2,85 X10 <sup>6</sup>
NºCEL/ GRAMA/FÍGADO	10.783.700	18.561.830	18.892.400	13.836.480	1.184.310	15.546.640	18.388.280
VIAB. AZUL TRIPAN %	100	99	89	92	30	60	65
VIAB. FLUORESCENCIA %	100	99	92	92	25	60	55

<b>GRUPO ESTUDO</b>	<b>04/11/2004</b>	<b>26/04/2005</b>	<b>12/09/2005</b>	<b>02/11/2005</b>	<b>10/04/2006</b>	<b>22/04/2006</b>	<b>03/07/2006</b>
FÍGADO (GAMAS)	13,000	16,720	12,291	13,000	11,800	10,260	16,011
Nº CÉLULAS/ ml	1,10 X10 <sup>6</sup>	2,75 X10 <sup>6</sup>	2,80 X10 <sup>6</sup>	1,85 X10 <sup>6</sup>	0,11 X10 <sup>6</sup>	1,75 X10 <sup>6</sup>	2,90 X10 <sup>6</sup>
NºCEL/ GRAMA/FÍGADO	8.538.460	16.447.370	22.780.900	14.230.770	915.300	17.056.530	18.112.550
VIAB. AZUL TRYPAN %	100	97	91	92	30	55	75
VIAB. FLUORESCENCIA %	100	97	87	99	30	65	65

As análises bioquímicas foram realizadas para a prática do dia 22/04/2006, os resultados das dosagens de albumina estão apresentados na TABELA 4, onde é mostrada a média diária por grupo.

TABELA 4: resultados das dosagens de albumina, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular. \*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Albumina	Grupo	N	Média mg/ml	DP	Valor p*
DIA 1	C	5	0,1515	0,0295	<b>0,0079</b>
DIA 1	E	5	0,0734	0,0221	
DIA 2	C	5	0,0640	0,0113	0,6905
DIA 2	E	5	0,0717	0,0119	
DIA 3	C	5	0,3451	0,0282	<b>0,0079</b>
DIA 3	E	5	0,2701	0,0259	

Na FIGURA 14 pode-se observar melhor a diferença entre as dosagens deste metabólito. Os dias 4 e 5 não foram apresentados na tabela por não ter sido possível dosar albumina no meio de cultura nestes dois dias.

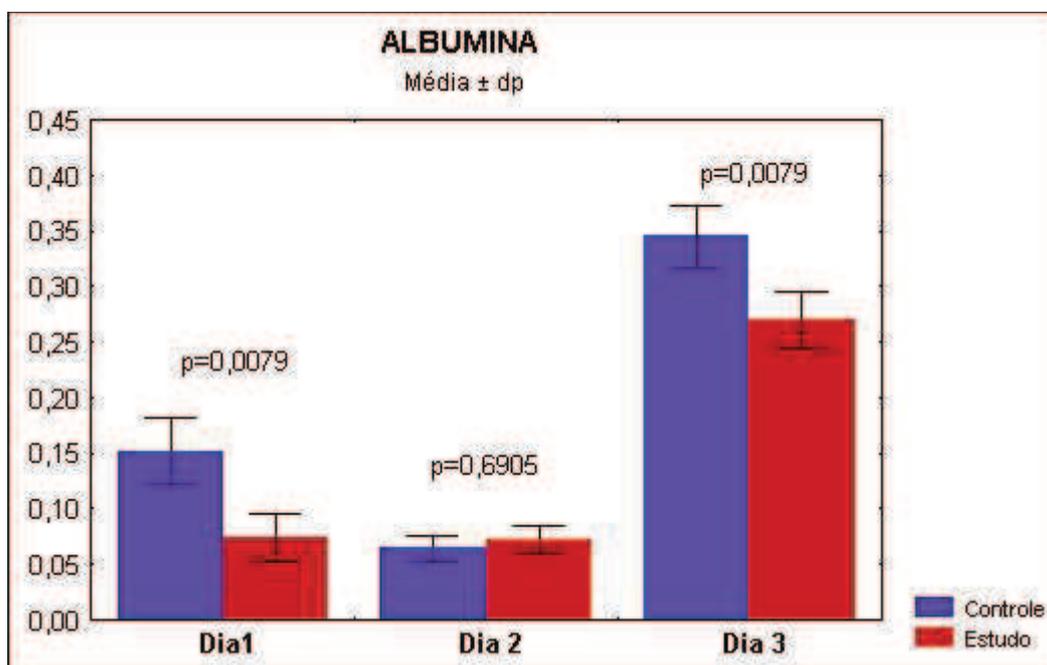


FIGURA 14: Gráfico de comparação dos valores das dosagens de albumina entre os dois grupos (controle e estudo) nos três dias de cultivo,  $p < 0,05$  nos dias 1 e 3 demonstrando significância estatística. Concentração da albumina em mg/ml.

Para cada grupo, testou-se a hipótese nula de que os resultados de albumina em dois dias sob comparação são iguais, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Os valores de p dos testes são apresentados na tabela 5.

TABELA 5: Resultados das dosagens de albumina, comparando-se os grupos X dia de cultivo celular. \* Teste não-paramétrico de Wilcoxon.

<b>Dias sob Comparação</b>	<b>GC – valor de p*</b>	<b>GE – valor de p*</b>
Dia 1 X dia 2	0,0431	0,8927
Dia 1 X dia 3	0,0431	0,0431
Dia 2 X dia 3	0,0431	0,0431

Os resultados das dosagens de MDA são apresentados na TABELA 6, onde é mostrada a média diária por grupo.

TABELA 6: Resultados das dosagens de MDA, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular. \*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Concentração do MDA em nmol/mg de proteínas.

<b>MDA</b>	<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média nmol/mg</b>	<b>DP</b>	<b>Valor p*</b>
DIA 1	C	5	0,8820	0,1676	<b>0,0079</b>
DIA 1	E	5	0,3070	0,1013	
DIA 2	C	5	0,1800	0,0830	0,8413
DIA 2	E	5	0,1670	0,0280	
DIA 3	C	5	0,1270	0,0444	0,5476
DIA 3	E	5	0,1380	0,0456	

Na FIGURA 15 pode-se observar melhor a diferença entre as dosagens. Os dias 4 e 5 não foram apresentados na tabela por não ter sido possível dosar MDA no meio de cultura nestes dois dias.

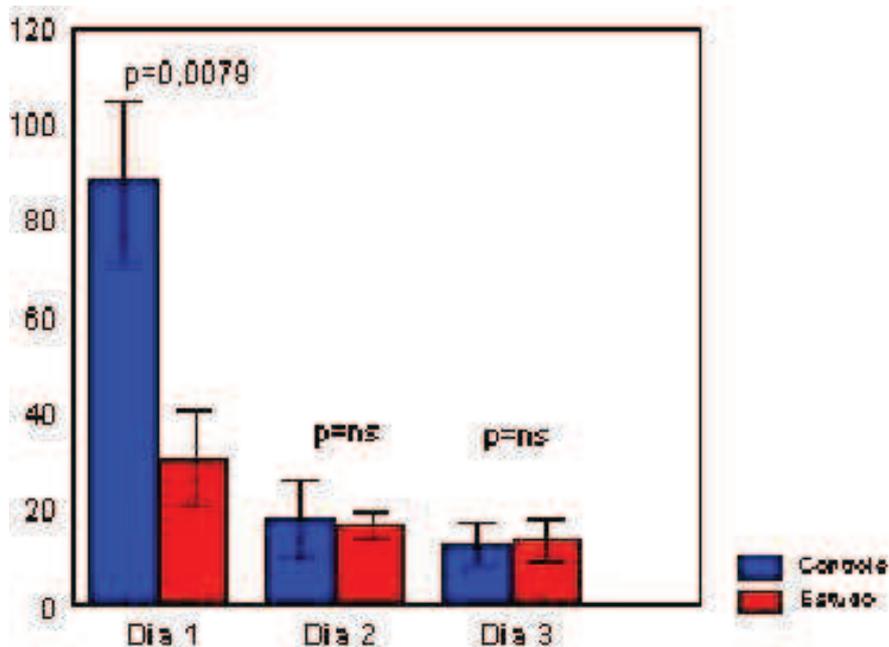


FIGURA 15: Gráfico de comparação dos valores das dosagens de MDA entre os dois grupos (controle e estudo) nos três dias de cultivo,  $p < 0,05$  no dia 1 demonstrando significância estatística. Concentração do MDA em nmol/mg de proteínas.

Para cada grupo, testou-se a hipótese nula de que os resultados do MDA em dois dias sob comparação são iguais, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Os valores de p dos testes são apresentados na TABELA 7.

TABELA 7: resultados das dosagens de MDA, comparando-se os grupos X dia de cultivo celular. \* Teste não-paramétrico de Wilcoxon

<b>Dias sob Comparação</b>	<b>GC – valor de p*</b>	<b>GE – valor de p*</b>
Dia 1 X dia 2	0,0431	0,0431
Dia 1 X dia 3	0,0431	0,0431
Dia 2 X dia 3	0,2733	0,2249

#### 4 – DISCUSSÃO

Para discussão deste trabalho foram considerados apenas os resultados da prática considerados ouro, para o rendimento dos hepatócitos os resultados alcançados foram semelhantes ao de STRAIN (1994), que afirma que apesar de muitas investigações o procedimento descrito por Berry ainda é o que trouxe a considerável melhora ao rendimento dos hepatócitos obtidos e concorda com GUGUEN-GUILLOUZO (1982) e STRAIN (1994), que afirmam que as técnicas de dissociação que utilizam a colagenase aumentam em cerca de 75% o rendimento dos hepatócitos obtidos de fígado de ratos, quando comparada às técnicas anteriores. XIAO-LI (2002) conseguiu em seu trabalho, com cultivo primário de hepatócitos, uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/ml.

Segundo BERRY e FRIENDS, (1969) as células dissociadas pela colagenase apresentam na sua maioria, membranas intactas ao microscópio e não são coradas pela azul de trypan (BERRY e FRIENDS, 1969). Este trabalho obteve resultados um pouco abaixo do descrito na literatura, contrariando a maioria dos autores que afirmam que a viabilidade inicial, quando utilizada a dissociação enzimática, é de aproximadamente 90% (KIKUGAWA, YASUHARA *et al.*, 2003; SHU, ZHAO *et al.*, 2004; THOMAS, BENENETT *et al.*, 2006). Na sua prática XIAO-LI (2002), obteve uma média de 88% de viabilidade de suas células utilizando a dissociação enzimática. Porém esses resultados não foram muito diferentes dos conseguidos por STROM *et al* (1982) que conseguiu viabilidade inicial de aproximadamente 70% utilizando a dissociação enzimática, e concorda também com os resultados de YUN-WEIN, NOBUHIRO, HIDEKI, (2005) que iniciaram seus estudos com hepatócitos com

viabilidade inicial próxima de 70% utilizando a mesma técnica de dissociação (STROM, JIRTLE *et al.*, 1982; XIAO-LI, LAN-JUAN *et al.*, 2002; ZHENG, OHKONCH *et al.*, 2005).

O rendimento e a viabilidade inicial não foram problemas para o desenvolvimento do trabalho, o maior empecilho foi o cultivo celular, pois as células não se fixavam ao substrato plástico. Várias alterações foram empregadas, pensando em uma eventual morte celular por danos causados durante a dissociação, mas que pudessem estar culminando com a morte dos hepatócitos em médio prazo, foram alteradas velocidades de centrifugação, agitação, e reagente para a dissociação celular.

Utilizou-se também um protocolo alternativo, modificado pela Boehringer Mannheim Corporation para tentar aumentar o potencial de aderência dessas células, mas essa prática não apresentou resultados satisfatórios, contrariando a literatura que demonstra que as variações da técnica de dissociação enzimática apresentam resultados satisfatórios quanto ao rendimento e a viabilidade. OHTAKE (2006) utilizando a técnica de Seglen, com pequenas alterações na centrifugação, conseguiu melhores resultados no rendimento dos hepatócitos (OHTAKE, MARUKO *et al.*, 2006). HARASHIMA (2006) utilizou a dissociação enzimática com  $2,5 \times 10^5$  cel/ml e viabilidade inicial ótima (HARASHIMA, NIIMI *et al.*, 2006). THOMAS (2006) trabalhou com a técnica de dissociação enzimática com pequenas alterações e conseguiu concentração inicial de 600.000 hepatócitos por ml com viabilidade celular inicial de 90% aproximadamente (THOMAS, BENENETT *et al.*, 2006).

Para que haja êxito no cultivo celular é preciso levar em conta alguns fatores, como a capacidade da célula de superar os processos de dissociação

e ainda de se aderir ao substrato e proliferar. O crescimento em mono capa significa que as células se aderem ao substrato e só depois iniciam a proliferação, muitas linhagens celulares, como, por exemplo, os hepatócitos, são dependentes do substrato, o que significa que, a célula não começa a proliferação até que tenha havido aderência no substrato (REINA, 2006).

Na tentativa de fazer com que os hepatócitos se aderissem ao substrato, o meio de cultura, também foi modificado durante o desenvolvimento do trabalho, acrescentou-se ao meio de cultura insulina bovina. A insulina é utilizada para manter a viabilidade e as funções dos hepatócitos (NAKAGIRI, ODA *et al.*, 2003). Para VOICI (1999) a insulina bovina é um suplemento essencial para o desenvolvimento das células hepatocitárias em cultura (VOICI, ARVIGO *et al.*, 1999). Esse hormônio é essencial para o trofismo e metabolismo dos hepatócitos que degeneram e morrem na ausência da insulina em meio de cultura (JESUS, WAITZENBERG *et al.*, 2000), porém apenas a adição da insulina bovina não trouxe o resultado descrito na literatura, ou seja, não houve aumento da adesão celular.

Muitos trabalhos mostram que hepatócitos adultos em cultura primária não apresentam proliferação celular satisfatória, pode-se tentar contornar esses problemas com adição de fatores que estimulem a divisão celular com a insulina e o fator de crescimento (ICHIHARA, NAKAMURA *et al.*, 1982; FRANCAVILLA, OVE *et al.*, 1986), tentou-se então melhorar a adesão dessas células adicionando-se fator de crescimento (hipotálamo de boi) ao meio. KANG e col. (2004) demonstram em seus estudos que hepatócitos em meio suplementado com fator de crescimento podem permanecer funcionais por até 12 dias. Porém mais uma vez o resultado não foi satisfatório como os descritos

na literatura, pois após a adição do fator de crescimento não foi possível perceber mudança nas células em cultura (KANG, BERTHIAUME *et al.*, 2004).

A dificuldade de adesão dos hepatócitos ao meio pode ter ocorrido por se ter trabalhado com células adultas, segundo ICHIHARA, NAKAMURA e TANAKA (1982) hepatócitos adultos em cultura primária conseguem passar do estágio G0 para o G1 para chegarem ao G2 e ao S precisam de um meio mais suplementado com insulina e fator de crescimento, porém mesmo com esses suplementos essas células não apresentam divisão celular e não conseguem chegar à fase M (ICHIHARA, NAKAMURA *et al.*, 1982). Segundo KUMAR (2002), células adultas não sobrevivem mais que 24 horas em cultura simples, em 48 horas são desintegradas no meio, não conseguem se aderir e tão pouco se proliferar. Em contraste hepatócitos fetais se aderem com facilidade e mantêm suas funções por 21 dias em cultura simples (KUMAR, MENON *et al.*, 2002). HERRERA *et al* (2002) demonstram em seus trabalhos que 100% dos hepatócitos fetais se aderem ao substrato após a suplementação do meio com fator de crescimento e no mesmo trabalho perceberam que hepatócitos adultos não respondem da mesma forma ao suplemento (HERRERA, ALVAREZ *et al.*, 2001; VALDES, ALVAREZ *et al.*, 2002).

Foi então acrescentado ao meio de cultura, junto com a insulina e o fator de crescimento a heparina que, atua como uma ponte entre o fator de crescimento, as células e o substrato, ajudando na aderência dos hepatócitos, GONZALEZ *et al* (2006). A heparina facilita a cultura por contribuir com a organização e aderência das células (GONZALEZ, FARALLI *et al.*, 2006) alguns estudos demonstraram a interação entre a heparina e os hepatócitos mantêm as funções destas células em cultura em longo prazo (LIN, MAEDA *et*

*al.*, 1997). Em 1993 estudos mostraram que fibroblastos em cultura com fator de crescimento e heparina humana mantêm a síntese de DNA e a proliferação das células (PANOS, RUBIN *et al.*, 1993). Em 2004 HATAKEYAMA *et al* demonstrou em seus trabalhos que a heparina aumenta a adesão de monócitos e linfócitos e aumenta a expressão e adesão das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e os resultados alcançados neste estudo, corroboram com a literatura, pois a heparina aumentou a capacidade dos hepatócitos se fixarem ao substrato e as células permaneceram aderidos por cinco dias (HATAKEYAMA, IMAIZUMI *et al.*, 2004).

A albumina é sintetizada exclusivamente pelo fígado, sendo que a sua concentração reflete o equilíbrio entre a síntese (produção) e a degradação (perda) de proteínas pelo órgão. A concentração sérica da albumina pode ser um indicador útil da alteração de função hepática (GOULART, 2003). A metodologia utilizada foi escolhida por ser rápida, fácil de realizar, apresentar um baixo custo, além de ser capaz de detectar baixas concentrações de albumina.

Este trabalho foi concordante com a maioria dos autores, pois os hepatócitos em meio de cultura básico ou pouco suplementado não se fixaram ao substrato e não foi possível fazer as provas bioquímicas para determinar síntese de albumina, mas segundo CREMA *et al* (1998) hepatócitos em cultura básico são capazes de se fixar e pode-se esperar uma secreção de 0,60 +/- 0,33 Ng/hora/10<sup>6</sup> de albumina, para hepatócitos em meio de cultura simples, essa função poderia ser mantida por até duas semanas.

Na prática onde houve aderência das células ao substrato plástico, e as dosagens de albumina foram realizadas, pode-se observar nos dias 1 e 3 um

valor aumentado nos dois dias para ambos os grupos com valor significativamente maior ( $p < 0,0079$ ) para GC em relação ao GE, também nos dois dias. Esse resultado era esperado para o primeiro dia de cultivo, porém a concentração aumentada no terceiro dia de cultivo entra em contradição com a literatura, discordando do que demonstra HONIGER *et al* (1995) que observou que a síntese de albumina foi mantida por um período maior para hepatócitos em cultivo no matrigel, chegando ao dia 10. No grupo de hepatócitos cultivados em substrato plástico a síntese foi observada apenas no dia 1 diminuindo significativamente no dia 2 e não sendo mais detectada no 3º dia (HONIGER, BALLADUR *et al.*, 1995). Já FIEGEL, *et al* (2000), demonstrou uma produção de 33,85 (+/- 9,7) pc/cel/dia em substrato de colágeno (FIEGEL, KAUFMANN *et al.*, 2000). NAKAGIRI (2003) observou uma produção de 2,63 Ng/6X10<sup>6</sup> hepatócitos em cultura de colágeno e segundo o autor a síntese de albumina é perdida em 1 ou 2 dias de cultura quando utilizado meio de cultura simples. KANG *et al* (2004) observou síntese de albumina similar para os grupos em colágeno-sandwich ou colágeno-matrigel-sandwich sendo possível detectar albumina apenas com os meios suplementados com fator de crescimento. KEUN-HONG e SOO (2006) observaram níveis elevados de albumina em cultura de hepatócitos em substrato de gel, que puderam ser detectados até o 7º dia. A maioria dos autores concorda que hepatócitos em cultura de matrigel, ou colágeno, ou ainda sandwich, se aderem melhor e mantêm suas sínteses bioquímicas por mais tempo (KEUN-HONG e SOO, 2006).

Apesar da metodologia para dosagem de albumina ter sido escolhida levando-se em consideração as particularidades deste trabalho, alguns problemas foram detectados, como a necessidade de interpretar os resultados

em conjunto com informações de outras avaliações, essa limitação não permitiu definir com exatidão se a concentração da albumina encontrada é devida à síntese dos hepatócitos (LOPES, 2004).

O processo de peroxidação lipídica gera subprodutos o MDA é um deles, cuja determinação no plasma, em tecido ou na urina é uma maneira de avaliar o estresse oxidativo (PERÓN, LÓPEZ *et al.*, 2001). A metodologia utilizada é a mais descrita na literatura para dosagem do MDA, sem a necessidade de se adquirir kit comercial. É uma técnica simples e rápida, com alta reprodutibilidade de resultados.

Neste trabalho foi observada uma diferença significativamente menor na produção de MDA, no dia 1, pelo GE=0,3070 nmol/mg de proteína (+/- 0,1013) em relação ao GC=0,8820 nmol/mg de proteína (+/- 0,1676). Corroborado por RHODEN e col., (1998), que em seu estudo *in vivo*, com reperfusão renal, observaram uma elevação significativa de malondialdeído, em animais não tratados com alopurinol quando comparados com àqueles que receberam a medicação. Os resultados obtidos foram GC=1,687 (+/- 0,21) nmol/mg de proteínas e GE=1,161 (+/- 0,16) nmol/mg de proteínas, em 1999 o mesmo grupo desenvolveu uma pesquisa com re perfusão hepática e os resultados obtidos foram de GC=0,285 nmol/mg de proteínas (+/- 0,022) e GE=0,165 nmol/mg de proteínas (+/- 0,021) (RHODEN, MAURI *et al.*, 1998). Os resultados apresentados por CASSANDRO *et al* (2003) que demonstraram mais uma vez o efeito inibidor do alopurinol em estudos com porcos, onde foi observada a diminuição na formação de RLOs após o tratamento dos animais com o medicamento sendo os resultados GC=2,0 nmol/mg de proteínas (+/-

0,4) e GE=0,60 nmol/mg de proteínas (+/- 0,06) (CASSANDRO, SEQUINO *et al.*, 2003), também corroboram os resultados deste estudo.

Outros autores concordam que o alopurinol diminui significativamente a produção do MDA, como por exemplo, MOLINA *et al.* (1993) que desenvolveu a pesquisa *in vivo*, sobre os efeitos do alopurinol nos rins, e concluiu que o medicamento é um forte inibidor competitivo da enzima xantina, diminuindo a produção dos RLO, porém por outro lado causando lesões renais por acúmulo da droga nos glomérulos. Ainda no ano de 1993 KARWINSKI e seu grupo estudaram o efeito do alopurinol em hepatócitos após uma hora de isquemia hepática. Esse trabalho demonstrou que o medicamento pode ter algum papel na melhora da preservação dos hepatócitos, mas ao que parece essa melhora é devido à preservação das funções celulares mais que inibição de espécies reativas ao oxigênio (KARWINSKI, ULVIK *et al.*, 1993). E ainda SHEHAB *et al.* em 2001 demonstraram a eficácia do alopurinol na redução da produção dos RLOs, em seu trabalho com falência crônica do coração (SHEHAB, BUTLER *et al.*, 2001). Finalmente em 2004 HERRERA *et al.* em seu trabalho com hepatócitos fetais *in vivo* e *in vitro*, observou que embora o alopurinol diminua o estresse oxidativo essa redução não chega a interferir no processo de morte celular (HERRERA, MURILLO *et al.*, 2004), corroborando assim com esse trabalho, que também não conseguiu demonstrar uma maior viabilidade celular dos hepatócitos extraídos do grupo de animais tratados com o medicamento.

## 5 - CONCLUSÕES

O alopurinol diminui a produção do MDA, demonstrando um menor estresse oxidativo nas células tratadas previamente com o medicamento. Porém essa diminuição não parece interferir na manutenção da viabilidade celular.

Sugere-se que a melhor técnica, para dissociação de hepatócitos é a descrita por Berry e Seglen.

Sugere-se ainda que o meio de cultivo seja suplementado para o crescimento destas células, acrescentando-se ao mesmo, insulina, fator de crescimento e heparina, quanto mais rico o meio de cultura, melhor a aderência dos hepatócitos.

## 6 - PERSPECTIVAS

- 1 - A continuidade dos estudos para encontrar o meio de cultivo ótimo para hepatócitos.
- 2 - Após a padronização do meio de cultura iniciar os estudos para encapsulação dos hepatócitos.
- 3 – Na última etapa transplantar os hepatócitos encapsulados.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLADUR, P., CREMA, E., *et al.* Transplantation of allogeneic hepatocytes without immunosuppression: Long-term survival. **Surgery**, v.117, n.2, p.189-194, feb 1994, 1995.

BAYLISS, K. M. e PAUL, S. Methods in molecular medicine: human cell culture protocols. **GE Jones Humana Press Inc**, p.369-390, 1996.

BERNUAU, J., RUEFF, B., *et al.* Fulminant and subfulminant liver failure: definition and causes. **Semin Liver Dis**, v.6, p.97-106, 1986.

BERRY, M. e FRIENDS, D. S. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. **The Journal of Biology**, v.43, p.506-520, 1969.

BORGES, F., FERNANDES, E., *et al.* Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, n.2, p.195-217, 2002.

CABRERA, T. C. e SERRANO, D. N. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. **Rev. Cubana Cardiol.**, v.14, n.1, p.55-60, 2000.

CASSANDRO, E., SEQUINO, L., *et al.* Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise – exposed guinea pigs – electrophysiological and biochemical study. **Acta Otolaryngol**, v.123, p.802-807, 2003.

CASTILLO, C., BENEDITO, J. L., *et al.* Importância del estres oxidativo en Ganado vacuno: en talación com el estado fisiológico (prenhez y parto) y la nutrición. **Arch. Med. Vet.**, v.33, n.1, p.5-20, 2001.

CASTRO, A. F., CASTRO, L. P. F., *et al.* Achados histológicos em 48 pacientes transplantados de fígado: biopsias do enxerto pós reperfusão (tempo zero) e de 3 a 15 dias pós-transplantes. **J. Brás. Patol. Méd. Lab.**, v.38, n.4, p.301-306, 2002.

COELHO, J. C., PAROLIN, M. B., *et al.* Causa de óbito tardio em transplantados de fígado. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.49, n.2, p.177-180, 2003.

CREMA, E. J. e GONÇALVES, J. E. **MODELOS EXPERIMENTAIS DE PESQUISA EM CIRURGIA: Transplante de hepatócitos**. Rio de Janeiro, v.1. 1998

CRYSTAL, R. G. e RAMON, J. R. GSH Systems. Glutation: eje de la defensa antioxidante. **Excerpta Médica**, p.1305-1312, 1992.

DEMETRIOU, A. A., REISNER, A., *et al.* Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats. **Hepatology**, v.8, p.1006, 1988.

DUTHIE, G. G. Determination of activity of antioxidants in human subjects. **Proc. Nutr. Soc.**, v.58, n.4, p.1015-1024, 1999.

FIEGEL, H. C., KAUFMANN, P. M., *et al.* Priming of hepatocytes for cell culture by partial hepatectomy prior to cell isolation. **Tissue Engineering**, v.6, n.6, p.619-626, 2000.

FRANCAVILLA, A., OVE, P., *et al.* Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. **Cancer Research**, v.46, p.1318-1323, 1986.

GERLACH, J. C. Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. **Hepatology**, v.22, n.2, p.546-552, 1995.

GONZALEZ, J. M. J., FARALLI, J. A., *et al.* Effect of heparin II domain of fibronectin on actin cytoskeleton and adherens junctions in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol.* **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.47, n.7, p.2924-2931, 2006.

GOULART, M. G. V. **Efeitos do verapamil (Dilacorón®), bloqueador dos canais de cálcio, na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GUERRA, J. I. E. Oxidación, entre la vida y la enfermedad. **An. Méd. Interna**, v.18, n.4, p.1-4, 2001.

GUGUEN-GUILLOUZO, C., CAMPION, J. P., *et al.* High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. **Cell Biology International Reports**, v.6, n.6, p.625-628, 1982.

HARASHIMA, M., NIIMI, S., *et al.* Change in annexin A3 expression by regulatory factors of hepatocyte growth in primary cultured rat hepatocytes. **Biol. Pharm. Bull.**, v.29, n.7, p.1339-1343, 2006.

HATAKEYAMA, M., IMAIZUMI, T., *et al.* Heparin inhibits IFN-gamma-induced fractalkine/CX3CL1 expression in human endothelial cells. *Inflammation.* **Inflammation**, v.28, n.1, p.7-13, 2004.

HENGSTLER, J. G., BRULPORT, M., *et al.* Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocytes. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v.1, n.1, p.61-74, 2005.

HENKENS, T., VANHAECKE, T., *et al.* Rat hepatocyte: conventional monolayer and cocultures with rat liver epithelial cells. **Methods Mol. Biol.**, v.320, p.239-246, 2006.

HERRERA, B., ALVAREZ, A. M., *et al.* Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  in fetal rat hepatocytes. **FASEB Journal**, v.15, p.741-751, 2001.

HERRERA, B., MURILLO, M. M., *et al.* Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  in fetal rat hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.1, p.16-26, 2004.

HEWITT, W. R., CORNO, V., *et al.* Isolation of human hepatocytes from livers rejected for whole organ transplantation. **Transplant Proc**, v.29, p.1945-1947, 1997.

HONIGER, J., BALLADUR, P., *et al.* Permeability and biocompatibility of a new hydrogel used for encapsulation of hepatocytes. **Biomaterials**, v.16, n.10, p.753-759, 1995.

ICHIHARA, A., NAKAMURA, T., *et al.* Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. **Molecular and cellular Biochemistry**, v.43, p.145-160, 1982.

JESUS, R. P., WAITZENBERG, D. L., *et al.* Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Rev. Ass Méd Brasil**, v.46, n.3, p.242-254, 2000.

KALIL, A. N. Transplante hepático: o dilema da falta de órgãos e da escolha do receptor ideal. **Jornal de Pediatria**, v.73, n.2, p.63-64, 1997.

KANG, Y. H., BERTHIAUME, F., *et al.* Growth factors and nonparenchymal cell conditioned media induce mitogenic responses in stable long-term adult rat hepatocytes culture. **Experimental Cell Research**, v.293, n.2, p.239-247, 2004.

KARWINSKI, W., ULVIK, R., *et al.* Effect of alopurinol on the concentration of endogenous glutathione in hepatocytes after an hour of normothermic liver ischemia. **Eur. J. Surg**, v.159, p.355-359, 04/05/1992, 1993.

KEHRER, J. P., PIPER, H., *et al.* Xanthine oxidase is not responsible for reoxygenation injury in isolated-perfused rat heart. **Free Radic. Res. Commun.**, v.3, p.69-78, 1987.

KEUN-HONG, P. e SOO, C. S. Morphology of spheroidal hepatocytes within injectable, biodegradable and thermosensitive poly (organophosphazene) hydrogel as cells delivery vehicle. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.3, p.238-242, 2006.

KIKUGAWA, K., YASUHARA, Y., *et al.* Effect of supplementation of n-3 Polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced DNA damage of rat hepatocytes. **Biol. Pharm. Bull.** , v.26, n.9, p.1239-1244, 2003.

KUMAR, A. P. R., MENON, B., *et al.* Culture of neonatal rat liver cells: A preliminary observation. . **Trends Biomater. Artif. Organs**, v.16, n.1, p.34-37, 2002.

LANGE, C., BRUNS, H., *et al.* Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. **World Journal Gastroenterology**, v.12, n.15, p.2394-2397, 2006.

LEITE, H. P. e SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev. Brás. Nutr. Clin.** , v.18, n.2, p.87-94, 2003.

LIN, K. H., MAEDA, S., *et al.* Long-term culture of primary rat hepatocytes on heparin or lambda carrageenan-containing collagen gels. **Biosc. Biothcnol. Biochem**, v.61, n.6, p.971-974, 1997.

LOPES, H. J. J. Procedimento operacional padrão - Dosagem de albumina. 2004. Disponível em: [www.goldalisa.com.br](http://www.goldalisa.com.br). Acesso em: 15/04/2005.

LOPES, S., JURISICOVA, A., *et al.* Reactive oxygen species: potencial cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. . **Human Reprod.**, v.13, p.896-900, 1997.

MAGALHÃES, H. M. Quantificação de proteínas como resultado da biodegradação de naftaleno por *Pseudomonas fluorescens* HK44. **Anais da XIII Jornada de Iniciação Científica** p.1-8, 2005.

MATES, J. M. Effects of antioxidants enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p.83-104, 2000.

MAZARIS, E. M., ROUSSOS, C. T., *et al.* Hepatocytes trasplantation: A review of worldwide clinical developments and experiences. **Experimental and Clinical Transplantation**, v.3, n.1, p.306-315, 2005.

MIES, S. Transplante de fígado. **Rev. Assoc. Méd. Brás.** , v.44, n.2, p.127-134, 1998.

MIRANDA, L. E. C., VIARO, F., *et al.* The experimental basis of hepatic ischemia-reperfusion injury: review. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n.1, p.1-12, 2004.

MITO, M., EBATA, H., *et al.* Morphology and function of isolated hapatocytes transplanted into rat spleen. **Transplantation**, v.28, n.6, p.499-505, 1979.

MOLINA, H. A., MANESCHI, E., *et al.* Efectos del allopurinol sobre el rinon. Su relacion com los radicales libres del oxigênio. **Acta Bioquimica Clinica Latinoamerica**, v.27, n.4, p.431-437, 1993.

NAKAGIRI, R., ODA, H., *et al.* Small scale rat hepatocytes primary culture with applications for screening hepatoprotective substances. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v.67, n.8, p.1629-1635, 2003.

NICOLUZZI, J. E. L., BARBU, V., *et al.* Viabilité et état de différenciation des hépatocytes humains immunoprotégés par macroencapsulation et transplantés chez le rat. **Gastroenterol Clin Biol.**, v.24, p.342-348, 2000.

NICOLUZZI, J. E. L., REPKA, J. C. D., *et al.* Viabilidade do fígado bioartificial utilizando hepatócitos humanos protegidos por macroencapsulação. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.31, n.5, p.311-317, 2004.

NORDLINGER, B., MARIANI, P., *et al.* Transplantation d'hépatocytes isoles. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v.18, p.68-77, 1994.

OHTAKE, Y., MARUKO, A., *et al.* Effect of retinoic acid-induced transglutaminase on cell growth in regenerating liver. **Biomedical Research**, v.27, n.2, p.75-80, 2006.

OLIVEIRA, C. P. M. S. Perfusão hepática e estresse oxidativo. Morfologia hepática. **Rev. de Hepatologia.**, 2000.

PANOS, R. J., RUBIN, J. S., *et al.* Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/ scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. **The Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.969-977, 1993.

PERCÁRIO, S., VITA, A. C. C., *et al.* Dosagem de malondialdeído. **NewsLab**, p.46-50, 1994.

PEREIRA, W. A. Manual de Transplantes de Órgão e Tecidos. **Medica e Cientif.**, 1996.

PÉREZ, L. M. Estrés oxidativo: La paradoja del oxígeno. **Rev. Cubana Endocrinol**, v.11, n.3, p.139-142, 2000.

PERÓN, J. M. R., LÓPEZ, J. R. M., *et al.* Radicales libres em la biomedicina e estrés oxidativo. **Rev. Cubana Méd. Milit.**, v.30, n.1, p.366-374, 2001.

RAMON, J. R. Protocols: Radicales libres y antioxidantes em clínica humana. **IDEPSA**, 1993.

REINA, M. Técnicas de estudio de líneas celulares. 2006. Disponível em: [www.cultek.com.br](http://www.cultek.com.br). Acesso em: 08/02/2006.

RHODEN, E. L., MAURI, M., *et al.* Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome da isquemia e reperfusão: Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.13, n.2, p.1-13, 1998.

\_\_\_\_\_. Taxa de mortalidade em ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol. **Acta Cir. Bras.**, v.14, n.4, 1999.

RHODEN, E. L., PEREIRA-LIMA, L., *et al.* The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: Experimental study in rats. **Eur. Surg. Res.**, v.32, p.215-222, 2000.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, M. A., SANTIAGO-OSORIO, E., *et al.* Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. **Ensayo Bioquímica.**, v.29, n.3, p.81-90, 2004.

SCHANAIDER, A. Radicais livres: “vilões” ainda em estudo. **Ciência Hoje.**, v.27, n.158, 60-62, 2000.

SEN, S. e JALAN, R. Ideal hepatocyte: Quest for the Holy Grail. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.20, n.1, p.1-4, 2005.

SETTE, J. R., BACCHELLA, H., *et al.* Critical analysis of the allocation policy for liver transplantation in Brazil. **Rev. Hosp. Clin.**, v.58, n.3, p.179-184, 2003.

SHEHAB, A. M. A., BUTLER, R., *et al.* A placebo-controlled study examining the effect of allopurinol on heart rate variability and dysrhythmia counts in chronic heart failure. **Clin Pharmacol**, v.51, p.329-334, 2001.

SHU, J. C., ZHAO, J. R., *et al.* An improved method for the isolation of rat hepatic stellate cells. **Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi**, v.12, n.6, p.353-355, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol**, v.82, p.291-295, 1997.

SORIANO, H. E., WOOD, R. P., *et al.* Hepatocellular transplantation (HCT) in children with fulminant liver failure. **Hepatology**, v.30, p.239A, 1997.

STRAIN, A. J. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. **Gut**, v.35, p.433-436, 1994.

STROM, S. C., CHOWDHURY, J. R., *et al.* Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. **Seminars in liver disease**, v.19, n.1, p.39-48, 1999.

STROM, S. C., JIRTLE, R. L., *et al.* Isolation, culture and transplantation of human hepatocytes. **JNCI**, v.68, n.5, p.771-778, 1982.

SUSSMAN, N. L., COHONG, M. G., *et al.* Reversal of fulminant hepatic using an extracorporeal liver assistance device. **Hepatology**, v.16, p.60-65, 1992.

THOMAS, R. J., BENENETT, A., *et al.* Hepatic stellate cells on poly (DL-lactic acid) surfaces control the formation of 3D hepatocyte co-culture aggregates in vitro. **European Cells and Materials**, v.11, p.16-26, 2006.

TONSO, A. **Monitoramento e operação de cultivo de células animais em sistema de perfusão**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

VALDES, F., ALVAREZ, A. M., *et al.* The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor  $\beta$  in fetal rat hepatocytes. **Molecular Cancer Research**, v.1, p.68-78, 2002.

VOCI, A., ARVIGO, M., *et al.* IGF-I production by adult rat hepatocytes is stimulated by transforming growth factor- $\alpha$  (and transforming growth factor- $\beta$ 1). **European Journal of Endocrinology**, v.140, p.577-582, 1999.

VRIEZEN, N., ROMEIN, B., *et al.* Effects of glutamine supply on growth and metabolism of mammalian cells in chemostat culture. **Biotechnol. Bioeng.**, v.54, n.3, p.272-286, 1997.

XIAO-LI, L., LAN-JUAN, L., *et al.* Isolation and primary culture of rat hepatocytes. **HBPD**, v.1, p.77-79, 2002.

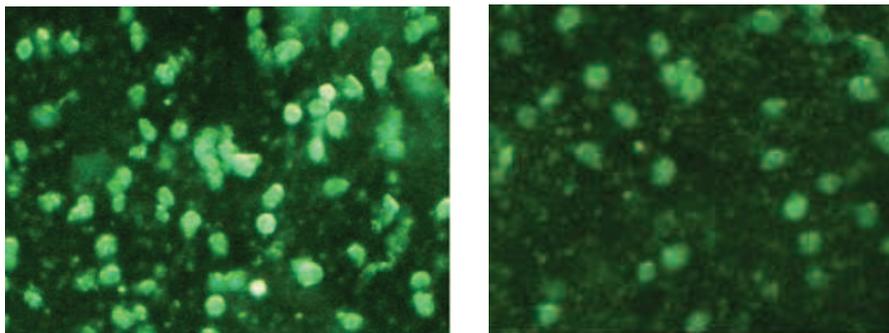
YAMAKAMI, L. Y., CARAVATTO, P. P. P., *et al.* Transplante de hepatócitos: Estado atual dos transplantes. **Hepato Ldta**, 2002.

ZHANG, Y. T., ZHENG, Q. S., *et al.* Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morfine and protected by antioxidants. **Pharmacology & Toxicology**, v.95, p.53-58, 2004.

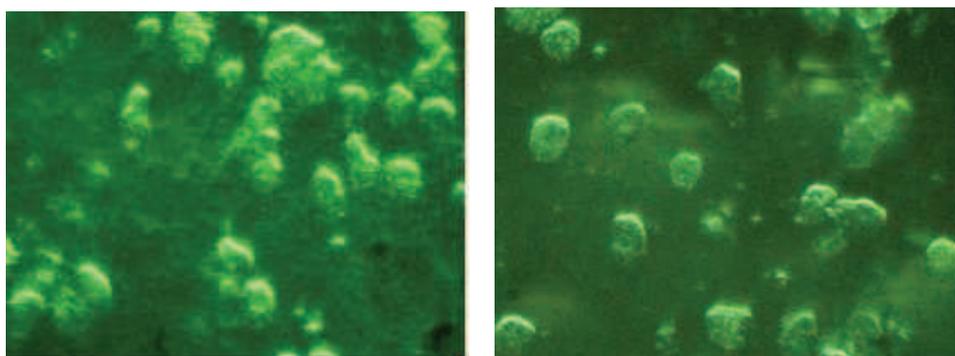
ZHENG, Y. W., OHKONCH, N., *et al.* Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. **World Journal of Gastroenterology**., v.11, n.39, p.6176-6181, 2005.

## 8 – ANEXOS

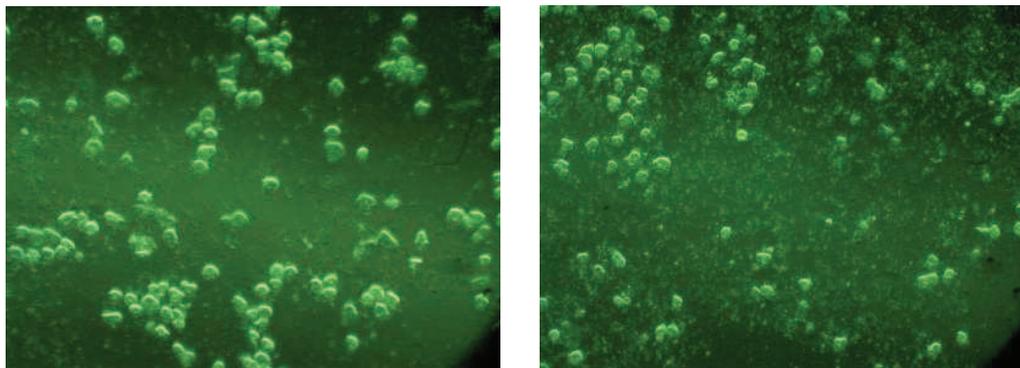
ANEXO 8.1 – Mostra as células (GC) em cultivo no 1º dia de cultivo a esquerda e 2º dia de cultivo a direita, as fotos mostram a perda considerável de células. Prática de 26/04/2005, aumento 4X MO.



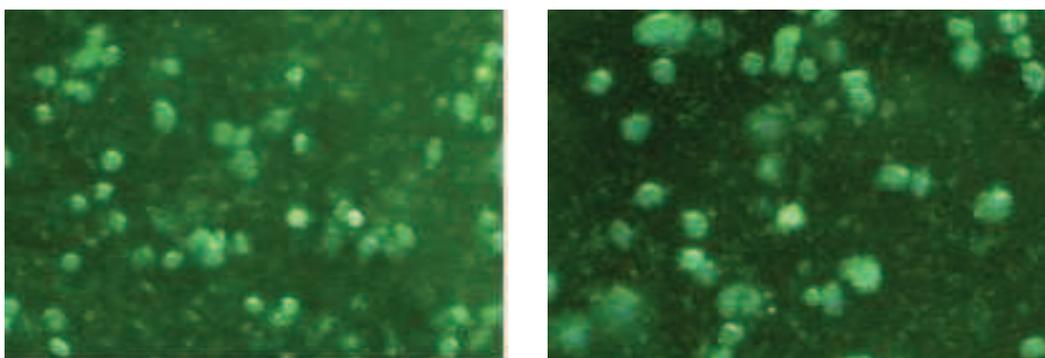
ANEXO 8.2 – Mostra as células (GE) em cultivo no 1º dia de cultivo a esquerda e 2º dia de cultivo a direita, as fotos mostram a perda considerável de células. Prática de 26/04/2005, aumento 20X MO.



ANEXO 8.3 – Mostra as células (GC) em cultivo no 1º dia de cultivo a esquerda e 5º dia de cultivo a direita. Prática de 10/04/2005, aumento 10X MO.



ANEXO 8.4 – Mostra as células (GE) em cultivo no 1º dia de cultivo a esquerda e 5º dia de cultivo a direita. Prática de 10/04/2005, aumento 10X MO.



ANEXO 8.5 – Hepatócito com características de célula morta (membrana rugosa e núcleo não visível) prática 10/04/2006 (a esquerda) e hepatócitos com membrana celular bem definida e núcleo visível, prática de 22/04/2006 (a direita). Aumento 40X MO.

