

Recebido em 08/2019. Aceito para publicação em 11/2020.

A ATUAÇÃO DA MEMBRANA AMNIÓTICA NA EXPRESSÃO DOS GENES CD206 E IL-12B NA FIBROSE HEPÁTICA BILIAR

THE ACTION OF THE AMNIOTIC MEMBRANE IN THE EXPRESSION OF GENES CD206 AND IL-12b IN BILIARY HEPATIC FIBROSIS

Roberta Jenniffer Maciel Teixeira¹

Ana Paula da Silva Alves²

Raissa Monteiro da Silva³

Renata de Azevedo Canevari⁴

Luciana Barros Sant'Anna⁵

Resumo: A fibrose hepática é a consequência das doenças crônicas do fígado, e quando não tratada evolui para a cirrose, cujo único tratamento efetivo é o transplante do órgão. Estudos prévios demonstraram que a membrana amniótica humana (MA), reduziu a fibrose biliar inibindo sua progressão para a cirrose hepática. Acredita-se que um dos mecanismos desta ação seja a modulação dos macrófagos M1 e M2, células que atuam na progressão e regressão da fibrose, respectivamente. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da MA na expressão de genes relacionados aos macrófagos M1 e M2 na fibrose hepática por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Duas semanas após a indução da fibrose pela ligadura do ducto biliar (LDB), um fragmento de MA foi aplicado ao fígado. Quatro semanas após a aplicação da MA, amostras do fígado foram submetidas a extração do RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR. Foi observado aumento significativo da expressão dos genes CD206, e IL-12b após a aplicação da MA em relação as amostras de fígado sem a presença da mesma, sugerindo que a MA pode estimular a expressão do gene CD206, que está associado ao macrófago M2, e reparação da fibrose, mas também pode ter o potencial de estimular a expressão do gene IL-12b, associada ao macrófago M1. Estes resultados sugerem a presença de ambos os subtipos de macrófagos durante a regressão da fibrose biliar, a qual foi evidenciada previamente pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando os mesmos grupos experimentais. Assim, estudos futuros com outros genes contribuirão para o melhor entendimento da ação antifibrótica da MA por meio do aumento de M2 no tecido hepático.

Palavras-chave: Expressão Gênica; fibrose hepática; macrófagos; membrana amniótica.

Abstract: Hepatic fibrosis is the consequence of chronic liver diseases, and if untreated, it progresses to cirrhosis, for which the only effective treatment is organ transplantation. Previous studies have shown that human amniotic membrane (AM) reduced biliary fibrosis, inhibiting its progression to liver cirrhosis. It is believed that one of the mechanisms for this action is the modulation of macrophages M1 and M2, cells that act in the progression and regression of fibrosis, respectively. The objective of this study was to analyze the effect of AM in the expression of genes associated with macrophages M1 and M2 in hepatic fibrosis by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). Two weeks after the induction of fibrosis by bile duct ligation (BDL), a fragment of AM was applied to the liver. Four weeks after the application of AM, liver samples were subjected to RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR. A significant increase in CD206 and IL12b gene expression was observed after AM application compared to the liver samples without it, suggesting that AM may stimulate CD206 gene expression, which is related to macrophage M2, and fibrosis repairs,

¹Graduanda de Odontologia pela Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: robertamaciel1502@gmail.com.

² Graduada de Biomedicina pela Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: anapaulalvesilva@live.com.

³ Mestre pela Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: raissa_monteiro_silva@yahoo.com.br.

⁴ Professora Doutora da Universidade do Vale do Paraíba e coordenadora do Laboratório de Biologia Molecular do Câncer - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, SP, Brasil. E-mail: rcanevari@univap.br.

⁵ Professora Doutora da Universidade do Vale do Paraíba e coordenadora do Laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa - IP&D, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, SP, Brasil. E-mail: lucianabsa@univap.br.

but it may also have the potential to stimulate the expression of gene IL-12b, related to macrophage M1. These results suggest the presence of both macrophage subtypes during biliary fibrosis regression, which has been previously shown by our research group, using the same experimental groups. Thus, future studies with other genes will contribute to a better understanding of the antifibrotic action of MA by increasing M2 in liver tissue.

Keywords: Gene expression; hepatic fibrosis; macrophages; amniotic membrane.

1 INTRODUÇÃO

Os macrófagos estão localizados em vários tecidos, sendo células fagocíticas do sistema imune inato e desempenham um papel central na modulação da inflamação. A grande maioria é derivada dos monócitos circulantes do sangue, que tem origem em células progenitoras da medula óssea, sendo essenciais na imunidade, no desenvolvimento e homeostase dos tecidos (KOO; GARG, 2019). Os macrófagos residentes no fígado são conhecidos como células de Kupffer, atuando tanto na manutenção da homeostase do órgão, quanto após injúrias crônicas ao fígado. Eles constituem uma população heterogênea de células imunes que exibem uma notável plasticidade, e podem se diferenciar em dois subtipos funcionais, exercendo ações tanto na progressão (macrófagos do tipo 1 - M1) quanto na resolução da fibrose hepática (macrófagos do tipo 2 - M2) (LI *et al.*, 2016). Estas células apresentam uma alta diversidade de liberação de citocinas e marcadores de superfície celular. O macrófago M1 tem como marcador de diferenciação o óxido nítrico sintase 2 (Nos2), mas também é caracterizado pela expressão dos genes das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL23 e IL-12b. Já o macrófago M2 tem como marcador de diferenciação a arginase (Arg1), e também é identificado pela expressão dos genes IL-10, CD206, CD163, quitinase 3 like 3 (Ym-1), entre outros (TACKE; ZIMMERMANN, 2014; WERMUTH; JIMENEZ, 2015; GIMENES *et al.*, 2016).

A fibrose hepática é uma temível consequência das doenças crônicas que acometem o fígado, sendo causada por diferentes injúrias incluindo consumo de álcool excessivo, infecção viral, distúrbios genéticos, metabólicas, tóxicas ou biliares, como as colelitíases, que são causadas por cálculos biliares ou tumores que obstruem o fluxo biliar do fígado para o duodeno (LI; CRAWFORD, 2004; KRENKEL *et al.*, 2018). Ela é caracterizada pela excessiva deposição de matriz extracelular (MEC) no parênquima hepático, distorcendo sua arquitetura e prejudicando a sua função. A fibrose quando não tratada progride e os septos fibróticos terminam por envolver nódulos de hepatócitos em regeneração, o que caracteriza o estágio final da doença, a cirrose hepática (KRENKEL *et al.*, 2018). A cirrose é a principal causa de hospitalização por doenças hepáticas, sendo a 8ª causa de morte no Brasil e 14ª no mundo (NADER.; MATTOS; BASTOS, 2014; GIMENES *et al.*, 2016). Os pacientes com cirrose também exibem um elevado risco de desenvolver hipertensão portal, falha irreversível do fígado e carcinoma hepatocelular (YANG *et al.*, 2011).

Apesar de consideráveis avanços no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares, e da engenharia de biomateriais, que vão tornando cada vez mais plausível a regressão da fibrose, atualmente ainda existem poucas opções de tratamento para esta doença. Estudos como de Biswas e Sharma (2016) ressaltam que existem poucos agentes farmacológicos desenvolvidos para o tratamento da fibrose, e os que são aprovados para administração agem em doenças específicas, desempenhando sua ação na fibrose dependendo da causa e do grau desta. Assim, o único tratamento efetivo é o transplante do fígado, o qual ainda apresenta limitações como o baixo número de doadores, necessidade do uso de terapia imunossupressora, suscetibilidade a rejeição imunológica, além de fatores legais, éticos, econômicas e religiosos (AZZAM *et al.*, 2007). Neste contexto, estratégias para reduzir a fibrose hepática, evitando ou prolongando a necessidade de transplante são essenciais.

O emprego da membrana amniótica (MA) representa uma alternativa terapêutica para a fibrose hepática (SANT'ANNA *et al.*, 2011). A MA constitui-se na camada mais interna das membranas fetais, que juntamente com a placenta é descartada após o parto. Assim, apresenta-se em alta quantidade e sua colheita não envolve procedimento invasivo, ético ou religioso. As células amnióticas humanas têm origem embriológica precoce, assim expressando marcadores de células tronco pluripotentes e sendo capazes de se diferenciar *in vitro* nos tecidos das três camadas germinativas (PAROLINI *et al.*, 2008). Além das células, a camada mesenquimal apresenta uma rica rede de fibras de colágeno, elastina, ácido hialurônico, lamininas e fibronectina, que proporcionam propriedades como estabilidade, flexibilidade, e permeabilidade, permitindo que ela seja utilizada como scaffold e substrato para proliferação de células e formação de tecidos (BOURNE; BENIRSCHKE, 1960; NIKNEJAD *et al.*, 2008; MAMEDE *et al.*, 2014). A MA tem sido utilizada com sucesso em vestibuloplastia (TSUNO *et al.*, 2014), recessões gengivais (SHETTY; CHATTERJEE; BOSE, 2014), defeitos na mucosa oral (KAR *et al.*, 2014), reconstrução vaginal (SEIFELDIN *et al.*, 2015), queimaduras (REILLY *et al.*, 2017), úlceras de pele (DEHGHANI *et al.*, 2017), e defeitos ósseos da calvária (FÉNELON *et al.*, 2018). Esses estudos provaram que o transplante de fragmentos de MA fresca e intacta é biocompatível, e exerce efeitos anti-doloríferos, antibacterianos, anti-inflamatórios e antifibróticos, auxiliando o processo de re-epitelização e reparo dos tecidos danificados (LIU, 2010; MANUELPILLAI *et al.*, 2012; MAYMÓ *et al.*, 2018).

Especificamente na fibrose hepática, os estudos pré-clínicos do nosso grupo demonstraram que a MA aplicada ao fígado no mesmo momento da indução da doença inibiu a progressão da fibrose hepática biliar para o estágio avançado, a cirrose, mas não foi capaz de prevenir a instalação daquela (SANT'ANNA *et al.*, 2011). Em um estudo posterior do nosso grupo foi verificada diminuição no grau de fibrose, redução de 50% na deposição de colágeno e dos miofibroblastos ativados após aplicação da MA, duas semanas de realizada a indução da fibrose biliar, sugerindo que um dos mecanismos de ação da MA na fibrose biliar estabelecida seja a redução das citocinas fibrogênicas

TGF- β 1 e a IL-6 (SANT'ANNA *et al.*, 2016). Entretanto, outros mecanismos também podem estar envolvidos na ação antifibrótica da MA, incluindo o aumento da atividade das metaloproteinases (enzimas que degradam a matriz extracelular), e mais recentemente a alternância dos subtipos de macrófagos presentes no fígado (SUN; KISSELEVA, 2015; JU; TACKE, 2016; BISWAS; SHARMA, 2016; EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2018). A hipótese do presente estudo é que a membrana exerça sua ação antifibrótica pelo aumento de expressão de genes relacionados aos macrófagos M2, os quais estão envolvidos na regressão da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o potencial da MA em modular a expressão de genes associados aos macrófagos M1 e M2 na fibrose hepática do tipo biliar por meio da técnica de RT-qPCR.

2 METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UNIVAP), no 2.077.418, de acordo com a Resolução no 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNIVAP), no A07/CEUA/2017 de acordo com a LEI 11.794/2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Colheita da placenta

Cinco placentas humanas foram obtidas por meio de cesárias eletivas de pacientes com gestação normal, do Hospital Santa Casa de São José dos Campos após o consentimento prévio da parturiente por meio do Termo de Consentimento livre e esclarecido, e posterior aos resultados laboratoriais negativos para hepatite B e C, sífilis e HIV. Após a coleta, o transporte da placenta para o Laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa, seguiu as normas padronizadas em estudos anteriores, como controle de temperatura e armazenamento em 10-15 °C, entretanto, sem contado direto com o gelo (SANT'ANNA *et al.*, 2011; BRITO, 2015).

2.2 Processamento da MA

Uma vez a placenta no laboratório, todos os procedimentos para o processamento da MA foram realizados em condições estéreis e sob uma capela de fluxo laminar. A primeira etapa foi destacar manualmente a MA do córion e lavá-la amplamente com solução fisiológica contendo 100U/ml de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e anfotericina. Logo após, a MA foi cortada em fragmentos de 6cm x 9cm, com marcações para identificação de sua face mesenquimal. Os fragmentos foram armazenados, por um período máximo de 24 horas após o processamento da membrana amniótica, separadamente, em frascos de 50 ml, em temperatura ambiente, contendo meio de cultura DMEN, para manutenção da integridade da MA, sem adição de soro e fenol-vermelho, em condições estéreis até o momento da aplicação nos animais (WOLBANK *et al.*, 2007; SANT'ANNA *et al.*, 2011; BRITO, 2015).

2.3 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 19 ratos machos *Rattus Norvegicus*, Albinos, Wistar, com peso aproximado de 200 a 250g, os quais após o período de aclimatização foram divididos, aleatoriamente, nos grupos: grupo normal (n=3), os animais não foram submetidos a nenhum procedimento, sendo usados como normalizadores na RT-qPCR; grupo LDB (n=6), onde os animais foram submetidos à ligadura do ducto biliar (LDB) e sacrificados após seis semanas e grupo LDB+MA₀ (n=10), onde os animais foram submetidos à LDB e após duas semanas da ligadura, um fragmento de membrana amniótica (MA) humana fresca foi aplicada ao redor de todos os lobos do fígado.

2.4 Modelo experimental de indução da fibrose hepática e colação da MA

Para a indução da fibrose, os animais foram anestesiados com isoflorano a 3%, por via inalatória, em câmara própria, e a anestesia foi mantida pela inalação de mistura de oxigênio (O₂) e isoflorano a 2,0%. A intervenção cirúrgica se iniciou com tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida de uma incisão na linha mediana e exposição do ducto biliar comum, o qual foi duplamente ligado com fio de sutura Seda 4-0 (Ethicon – Johnson & Johnson). A primeira ligadura foi realizada na junção dos ductos hepáticos e a segunda ligadura, acima da entrada do ducto pancreático, conforme relatado por Chen, et al. (CHEN *et al.*, 2009). O ducto biliar comum foi então seccionado entre as ligaduras. Logo após, a incisão abdominal foi fechada em dois planos com fio de sutura seda 4-0 (tecido muscular) e 3-0 (tecido epitelial) (Ethicon– Johnson & Johnson). Assim, os animais tiveram total, permanente, obstrução biliar (BRITO, 2015). Nos animais do grupo LDB+MA₀, antes do fechamento da parede abdominal, um fragmento de MA foi colocado no fígado com o seu lado mesenquimal em contato com a superfície do fígado. Após este procedimento, o abdômen foi fechado. Nos cinco dias após a cirurgia, cada animal recebeu antibioticoterapia (Duotril 2,5% 0,04mg/g), e uma vez por semana, aplicou-se vitamina K (5mg/kg) para a prevenção da mortalidade por hemorragias, ambos administrados por via subcutânea.

2.5 Eutanásia e obtenção das amostras

Após quatro semanas da aplicação da MA, os animais foram eutanasiados com overdose do mesmo anestésico utilizado para a sedação, e amostras do fígado foram coletadas dos lobos medial e direito, colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em tubos criogênicos em freezer à -80°C no Laboratório Central Analítica – IPD/UNIVAP para a análise de RT-qPCR, a qual foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da mesma Instituição. Assim para as análises da expressão gênica foram utilizadas 12 amostras do fígado (grupo LDB, n=6), e 20 amostras do fígado (grupo LDB +MA₀, n=10).

2.6 Análise da expressão gênica

2.6.1 Extração, purificação e quantificação do RNA

A extração do RNA foi realizada segundo o protocolo estabelecido para o *SV Total RNA Isolation System-Promega®*. As caracterizações quantitativas e qualitativas das amostras de RNA extraídas foram realizadas pelo método de espectroscopia de absorção no ultravioleta no equipamento *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e eletroforese em gel de agarose a 1%, respectivamente.

2.6.2 Síntese do cDNA

A síntese de cDNA foi realizada pelo sistema de pré-amplificação *ImProm-II™ Reverse Transcription System- Promega®*.

2.6.3 RT-qPCR

Os genes *IL-10*, *CD163*, *IL-12b* e *CD206* que estão associados aos macrófagos M1 e M2 foram selecionados para serem analisados pela RT-qPCR. Os iniciadores para amplificação destes e para o gene endógeno *B-actin* foram desenhados no software *Primer Express* (versão 3.0) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Tabela 1). A detecção de alterações de expressão gênica pela RT-qPCR foi realizada no equipamento *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems* (Life Technologies, USA). Para a RT-qPCR foi utilizado o kit *GoTaq® qPCR Master Mix Promega®*.

Tabela 1 - Primers utilizados para analisar a expressão de genes de macrófagos M1 e M2.

Genes	Forward	Reverse	Amplicon	Penalidade
<i>IL-10</i>	GAGGCCTGAAGAACATTCTGA	CACCAGGCCTCCTCTTGATCT	75	126
<i>CD163</i>	TGCTCAGGCCACAGGAA	GACCGGAACATGGGATTTTC	55	29
<i>IL-12b</i>	TGCTGGTGTCTCCACTCATG	GCCAGTCCACCTCTACAACAT	69	96
<i>CD206</i>	GCCGAGCCATGAGAACA	CCATCCTTCCCTTTCATCAC	57	38
<i>b-Actin</i>	ACCCACACTGTGCCCATCT	AGACGCAGGATGGCATGAG	56	32

Fonte: Os autores.

2.6.4 Análise dos resultados e estatística

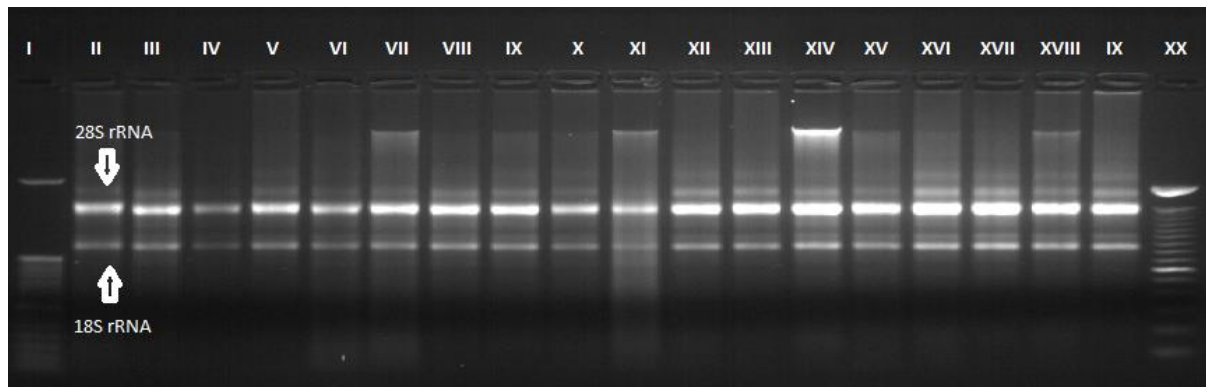
Após a realização da RT-qPCR, os dados das análises de expressão foram calculados pelo método Delta Delta Ct, que permite analisar os valores de QR (quantificação relativa) para cada um dos genes analisados. Os valores médios dos Cts obtidos para os genes alvos foi comparado com a média dos Cts do gene endógeno e normalizados pela média das amostras normais, resultando nos valores de QR ou *fold change*. Os *thresholds* definidos foram os mesmos em todas as corridas de RT-qPCR. O *fold change* ($2^{(-\text{Delta Delta Ct})}$), que consiste no valor da expressão do gene normalizado ($2^{(-\text{Delta Ct})}$) nas amostras do grupo experimental dividido pela

expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta Ct)}$) na amostra do grupo controle (tecido normal), foi calculado para cada gene. Este cálculo é dado pela fórmula: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Em seguida foi realizado o teste não paramétrico de *MannWhitney* na comparação entre os valores de QR das amostras pertencentes ao grupo LDB e ao grupo LDB+MA₀. As medianas entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$. Esta análise e a construção dos gráficos foram realizadas no software *GraphPad Prism versão 5.00* (GraphPad Software, CA, USA).

3 RESULTADOS

A análise quantitativa de todas as amostras de RNAs extraídos realizada pela espectroscopia de absorção no ultravioleta, mostrou que a maioria dos RNAs apresentaram razões de 260/280 e 260/230 dentro do esperado, acima de 1.8 e concentrações em média de 925,35 ng/μL. Estes resultados demonstraram a ausência de contaminação por proteínas e reagentes. Todos os RNAs obtidos apresentaram-se íntegros na eletroforese em gel de agarose, requisito para a realização da análise de RT-qPCR (Figura 1).

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA, visualizado pelas bandas 28S e 18S, de fígado de ratos dos grupos normal, LDB e LDB+MA₀. I e XX: marcador de peso molecular de 100pb. II a VI: amostras do grupo LDB. VII a XVI: amostras de RNA do grupo LDB+MA₀. XVII a XIX: amostra de RNA do grupo normal.

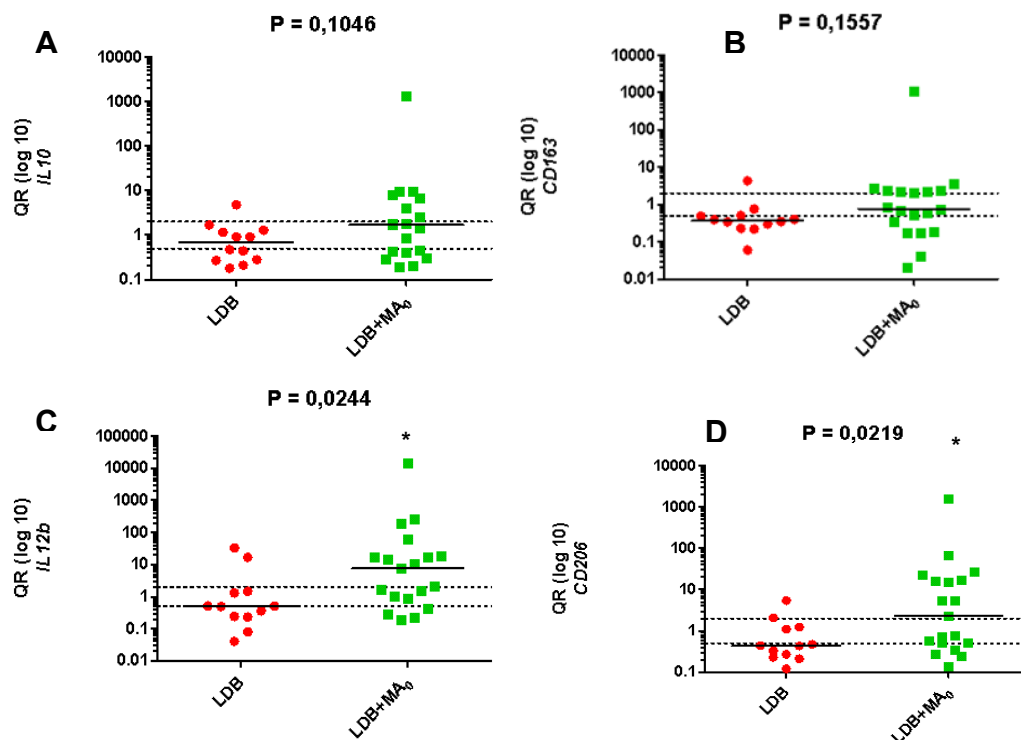


Fonte: Os autores.

Na análise de expressão do gene *IL12B* observou-se diminuição de expressão em quatro amostras (QR = 0,03 a 0,37), aumento de expressão em duas amostras (QR = 12,28 e 24,41) e expressão normal em duas amostras (QR = 0,97 e 1,06) no grupo LDB em comparação com o grupo de amostras de fígado normal. No grupo LDB+MA₀, quatro amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,14 a 0,33), 10 amostras apresentaram aumento de expressão (QR = 5,59 a 11105,51) e cinco amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,67 a 1,60) em relação o grupo de amostras de fígado normal. Na comparação entre os dois grupos foi observado aumento de expressão significativa no grupo LDB+MA₀ em relação ao grupo LDB. ($P = 0,0244$) Na análise do gene *CD206*, no grupo LDB, oito amostras apresentaram diminuição de

expressão (QR = 0,10 a 0,37), uma amostra apresentou aumento de expressão (QR = 4,20) e três amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,86 a 1,59). No grupo LDB+MA₀, sete amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,11 a 0,45), nove amostras apresentaram aumento de expressão (QR = 4,19 a 1227,11) e em três amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,57 a 1,83). Na comparação entre os dois grupos foi observada diferença significativa ($P = 0,0219$). Para o gene *IL10*, no grupo LDB, quatro amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,22 a 0,34), duas amostras apresentaram aumento de expressão (QR = 2,03 e 5,80) e seis amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,57 a 1,56). No grupo LDB+MA₀, quatro amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,23 a 0,36), 10 amostras apresentaram aumento de expressão (QR = 2,03 a 1.660,46) e cinco amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,51 a 1,74). Na comparação entre os dois grupos não foi observada diferença significativa ($P = 0,1046$). Para o gene *CD163*, no grupo LDB nove amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,06 a 0,49), uma amostra apresentou aumento de expressão (QR = 4,27) e duas amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,50 e 0,75). No grupo LDB+MA₀, seis amostras apresentaram diminuição de expressão (QR = 0,02 a 0,35), oito amostras apresentaram aumento de expressão (QR = 2,02 a 1068,85) e em cinco amostras apresentaram expressão normal (QR = 0,51 a 0,86). Na comparação entre os dois grupos não foi observada nenhuma diferença significativa ($P = 0,1557$). Desta forma, os resultados mostraram diferença significativa na expressão gênica apenas para os genes *IL-12b* e *CD206*, com aumento de expressão no grupo tratado com MA, quando comparado ao grupo LDB (Figura 2).

Figura 2 - Níveis de expressão dos genes *IL-10* (A), *CD163* (B), *IL-12b* (C) e *CD206* (D), e dos grupos LDB e LDB+MA₀. Os valores do nível de expressão (QR: quantificação relativa) foram plotados em uma escala logarítmica de 10. Médiana: representada pela linha preta entre as amostras de cada grupo). Teste estatístico não paramétrico *Mann Whitney*. ($p \leq 0,05$). * estatisticamente significativo.



Fonte: Os autores

4 DISCUSSÃO

Neste estudo a aplicação da MA sobre o fígado ocorreu somente após duas semanas da indução da fibrose, ou seja, com a doença já instalada, estratégia esta que é observada na realidade clínica dos pacientes com fibrose hepática, que normalmente, descobrem a doença em estágios mais avançados. O modelo experimental da ligadura do ducto biliar em ratos reproduz as características patológicas da fibrose do tipo biliar causada pela colestase (LI; CRAWFORD, 2004). A característica da fibrose depende da etiologia subjacente, sendo que na fibrose hepática biliar causada pela colestase há o surgimento de lesões em torno do epitélio do ducto biliar, devido ao estresse biomecânico causado pela LDB. Isto desencadeia uma proliferação compensatória das células epiteliais biliares, com ativação massiva de miofibroblastos, derivados, principalmente, dos espaços porta do fígado, e excessiva deposição de colágeno ao redor dos ductos que se expandem pelo parênquima hepático (TAG *et al.*, 2015; DOOLEY *et al.*, 2018). Neste tipo de fibrose as estruturas biliares expandidas interagem tanto com os miofibroblastos, quanto com outras células do sistema imune, por exemplo, macrófagos, por meio de citocinas fibrogênicas e pró-inflamatórias, iniciando e estimulando a progressão da patologia (DOOLEY *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019;).

Mohamed *et al.* (2016) em seus estudos experimentais utilizando células troncos mesenquimais originadas da medula óssea (BM-MSCs) para o tratamento da fibrose hepática induzida pela ligação do ducto biliar (LDB) respaldou, que ao contrário de outros modelos de fibrose hepática, a recuperação espontânea da fibrose devido à alta capacidade de autorregeneração do tecido hepático não é observada no modelo de LDB, isto embasa ainda mais a escolha desta técnica para indução de fibrose hepática em nosso estudo devido seu alto potencial de acometimento e baixa irreversibilidade espontânea.

Nossos estudos prévios (SANT'ANNA *et al.*, 2011; 2016; 2017) demonstraram que a MA reduziu a área de estruturas biliares expandidas, a deposição de colágeno, os miofibroblastos ativados e as citocinas fibrogênicas no tecido hepático. Os mecanismos de regressão da fibrose hepática têm sido objeto de estudos nos últimos anos com o intuito de desenvolver alvos específicos para novas terapias antifibróticas (SUN; KISSELEVA, 2015; JU; TACKE, 2016; EBRAHIMI; NADERIAN; SOHRABPOUR, 2018). Assim, neste estudo avaliamos um dos mecanismos da ação antifibrótica da MA, ou seja, sua possível ação sobre os macrófagos. Para isto foi analisada a expressão do gene *IL-12b* (para M1), e os genes *IL-10*, *CD206* e *CD163* (para M2). Os resultados obtidos demonstraram, que no grupo tratado com a MA ocorreu aumento de expressão significativa dos genes *IL-12b* e *CD206* quando comparados ao grupo sem a aplicação da MA (grupo LDB). A expressão aumentada do gene *CD206* sugere que a MA pode estar alterando o microambiente do fígado para um ambiente que facilite a reparação da fibrose, uma vez que este gene está associado especificamente com os macrófagos reparadores do tipo M2. Esta sugestão pode ser suportada pela evidência dos macrófagos, durante a patogênese da fibrose hepática, alternarem entre diferentes fenótipos ou diferentes estados de ativação, dependendo dos sinais que recebem de diferentes ambientes teciduais (GUILLOT; TACKE, 2019). A transição de um fenótipo inflamatório (tipo M1) para um fenótipo de cicatrização/reparo (tipo M2) induz a progressão da fase de inflamação para a fase de reparação tecidual, onde há a produção de quantidades consideráveis de citocinas e fatores de crescimento que promovem a proliferação de vários tipos de células envolvidas na reparação de tecidos danificados (WERMUTH, JIMENEZ, 2015; GIMENES, 2016; ZOU *et al.*, 2018).

Mamede e Sant'Anna (2019) demonstraram, por meio da imunoexpressão do CD68 (marcador geral de macrófago), uma diferença extremamente significativa no número macrófagos presentes na região periportal do fígado do grupo tratado com MA. Eles hipotetizaram que o número superior de macrófagos na região periportal, juntamente com a menor quantidade de colágeno no grupo tratado com MA, poderia sugerir a presença de macrófagos restauradores capazes de expressar metaloproteinasas e citocinas anti-inflamatórias que reparam a fibrose hepática. No presente estudo esta hipótese pode ser suportada pelo aumento no nível de expressão dos genes associados ao macrófago reparador ou tipo 2 (M2), principalmente na expressão do gene *CD206*, o qual demonstrou um aumento extremamente significativo,

quando comparado ao grupo LDB. Além disso, a MA libera fatores imunomoduladores, que estimulam a presença do macrófago com fenótipo pro-regenerativo na resolução do processo fibrótico (SILINI *et al.*, 2015).

Atualmente, estudos têm investigado o uso de células isoladas de diferentes regiões da placenta como uma fonte potencialmente útil de células e tecidos para transplante e medicina regenerativa, visando restaurar tecidos e órgãos (SILINI *et al.*, 2015). Entretanto, os estudos, *in vivo*, que associam os macrófagos como alvos da ação anti-inflamatória e reparadora dessas células estão relacionados à fibrose pulmonar (MURPHY *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2014). Na fibrose hepática, apenas o estudo de Manuelpillai *et al.*, (2012), utilizando o transplante de células epiteliais amnióticas humanas (hAEC) em camundongos com fibrose hepática avançada induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄), apresentou expressão aumentada dos genes associados a macrófagos M2, incluindo *YM-1*, *IL-10* e *CD206* nos animais tratados com hAEC. Estes resultados corroboram com nosso estudo, no que se refere ao gene *CD206*, mas difere, com relação ao gene da *IL10*. Essas diferenças podem estar relacionadas ao modelo experimental de indução da fibrose (CCl₄ x LDB), e a terapia utilizada (células epiteliais amnióticas x membrana amniótica). Por outro lado, Kubo *et al.* (2015) utilizaram o transplante de células mesenquimais amnióticas humanas (hAMSCs), no modelo de CCl₄ e verificaram uma redução dos parâmetros histológicos da fibrose (colágeno e miofibroblastos), aumento de MMPs e de acordo com o nosso estudo, ausência de expressão diferencial significativa para o gene *IL-10*,

Xu *et al.*, (2019) destacou que a citocina IL-10 é um mediador anti-inflamatório e antifibrótico, exercendo influência sobre o sistema imune e apresentando uma relação com a citocina IL-12. Neste estudo, a indução da fibrose foi feita com CCl₄ e a terapia adotada como tratamento foi a injeção de células tronco da medula óssea nos ratos após a instalação da patologia. A expressão das citocinas IL-10 e IL-12 foram quantificadas pelo método de ELISA, e foi inversamente proporcional, ou seja, IL-10 apresentou expressão aumentada no grupo tratado com as células e IL-12 apresentou diminuição de expressão significativa. Em nosso estudo, não observamos a expressão reduzida para o gene *IL-12*, contudo essas diferenças podem estar relacionadas ao modelo experimental de indução da fibrose e terapia utilizada. Além disso, sabe-se que a expressão proteica nem sempre corresponde a expressão gênica podendo, portanto explicar os resultados divergentes encontrados para o gene *IL-12*, onde provavelmente nem todo o mRNA expresso, detectado aumentado em nosso estudo, foi codificado na proteína IL-12 evidenciado como redução de expressão no estudo de Xu *et al.*, (2019). Segundo Eckert *et al.* (2015) e Ramachandran, Iredale e Fallowfield (2015) resultados diferentes entre os estudos, com relação aos tipos celulares e a expressão gênica e proteica nas células envolvidas durante a regressão da doença, ocorrem devido à etiologia da fibrose hepática, ou seja, a forma como ela foi induzida (CCl₄ x LDB) resultando em um padrão histopatológico diferente.

O estudo de Luo *et al.*, (2019) investigou a ação da terapia usando transplante de

células estromais mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) sobre a fibrose hepática induzida por injeção intraperitoneal de CCl_4 em camundongos e os mecanismos subjacentes baseados na regulação dos subtipos de macrófagos. Os resultados da imunofluorescência dos marcadores de macrófagos Nos2 (M1) e CD206 (M2) revelaram, que os M1 aumentaram drasticamente em fígados de fibrose induzida por CCl_4 , mas diminuíram significativamente após o transplante de BM-MSC, uma vez que os M2 tiveram um aumento exponencial neste segundo grupo. Este resultado corrobora com o aumento de expressão do gene *CD206*, marcador do M2, observada em nosso estudo no grupo tratado com MA, sugerindo que a terapia tanto com BM-MSCs quanto com MA contribui para promover a resolução da fibrose por meio da ação do M2.

Segundo os estudos de Li *et al.* (2016) é difícil distinguir estritamente os macrófagos hepáticos em dois subgrupos funcionais, porque algumas das células expressam moléculas tanto de M1 e quanto de M2, sugerindo que essa classificação não é totalmente aplicável. Por exemplo, ambos os tipos de macrófagos exprimem as moléculas CD68 e CD163, logo, alguns estudos sugerem outro sistema de classificação, divididos por função: macrófagos defensivos, similares ao M1 por produzirem citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e IL-23; macrófagos restauradores que estariam relacionados a regressão da fibrose; e os reguladores, similares ao M2 devido a expressão de TGF- β 1 e IL-10, mas principalmente o alto nível da IL-10, o que diminui o TGF β 1, e permite assim atuar no reparo da fibrose. Isto sugere que o efeito dos macrófagos na fibrose hepática é governado pelos níveis globais de diferentes citocinas. Então, segundo este estudo, não é possível distinguir completamente qual o tipo específico de macrófagos, pois um tipo pode se diferenciar em outro tipo. Adicionalmente, alguns macrófagos podem, por exemplo, secretar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ao mesmo tempo (MOSSER; EDWARDS, 2008; TACKE; ZIMMERMANN, 2014; LI *et al.*, 2016, GUILLOT; TACKE, 2019). Eckert *et al.* (2015) observaram a presença de ambos os macrófagos próximos aos septos fibróticos no fígado com fibrose, o que indica uma comunicação entre estes tipos, ainda não totalmente elucidada. Estes estudos podem explicar a expressão aumentada que detectamos após a terapia com a MA para o gene *IL-12b*, gene envolvido com o M1 relacionado com o processo inflamatório hepático.

Vários fatores se somam e tornam estudos como o nosso importantes para o estabelecimento de uma terapia eficaz e com mínimos efeitos colaterais. Nosso estudo foi pioneiro na avaliação de genes relacionados aos macrófagos, como alvos da ação antifibrótica da membrana amniótica na fibrose do tipo biliar resultante da obstrução do fluxo biliar (colestase), desordem hepática crônica, que quando não tratada evolui para cirrose biliar primária e secundária, as quais estão associadas com intensa proliferação de ductos biliares, excesso de colágeno e também com resposta imune alterada, via células do fígado, incluindo as células de kupffer e o equilíbrio entre os tipos de macrófagos M1 e M2 (SATO *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que a MA foi aplicada na forma patch (i.e. fragmento de MA intacta aplicada na superfície do fígado), não sendo necessário um processamento

complexo e custoso, caso suas células fossem isoladas, cultivadas e injetadas no órgão, e ainda preservando todo o microambiente (estroma ou matriz) da MA, onde estão os fatores solúveis bioativos responsáveis pela ação da membrana na forma de patch (SILINI *et al.*, 2013; SILINI *et al.*, 2017). Adicionalmente, sua baixa imunogenicidade a torna um material biocompatível permitindo seu transplante sem induzir rejeição imunológica no hospedeiro (KUBO *et al.*, 2001; NIKNEJAD *et al.*, 2008; MAMEDE *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a MA humana quando aplicada no fígado cobrindo sua totalidade estimulou a expressão do gene *CD206* associado ao macrófago reparador M2. A expressão diferencial observada deste gene no fígado pode ser um dos fatores que contribuem para a redução do grau de fibrose biliar após a aplicação da MA evidenciada em estudos prévios, evitando sua progressão para o estágio terminal da doença, a cirrose hepática. Considerando que observamos que a MA também pode estar relacionada com o aumento de expressão do gene da citocina *IL-12b* associada ao macrófago M1, recomendamos a necessidade da realização da análise de um painel de genes envolvidos nas vias de inflamação e reparo da fibrose, para a completa elucidação da ação antifibrótica da MA no tecido hepático.

REFERÊNCIAS

- AZZAM, H. S. *et al.* Natural products and chronic hepatitis C virus. **Liver International**, v. 27, n. 1, p. 17-25, 2007.
- BISWAS, S.; SHARMA, S. Hepatic Fibrosis and its Regression: The Pursuit of Treatment. *Journal of Liver Research*, **Disorders & Therapy**, v. 2, n. 2, p. 36-39, 2016.
- BOURNE, Gordon L.; BENIRSCHKE, Kurt. Absent umbilical artery: a review of 113 cases. **Archives of disease in childhood**, v. 35, n. 184, p. 534, 1960.
- BRITO, Flaviane de Souza. **Avaliação do tecido hepático sob influência da membrana amniótica humana na fibrose hepática biliar em ratos**. São José dos Campos, SP, 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2015.
- CHEN, W. Y. *et al.* Chromium attenuates hepatic damage in a rat model of chronic cholestasis. **Life Sci.**, v. 84, p. 606–614, 2009.
- DEHGHANI, Mehdi *et al.* Grafting with cryopreserved amniotic membrane versus conservative wound care in treatment of pressure ulcers: a randomized clinical trial. **Bulletin of Emergency & Trauma**, v. 5, n. 4, p. 249, 2017.
- DOOLEY, James S. *et al.* **Sherlock's diseases of the liver and biliary system**. John Wiley & Sons, 2018.
- EBRAHIMI, Hedyeh; NADERIAN, Mohammadreza; SOHRABPOUR, Amir Ali. New concepts on reversibility and targeting of liver fibrosis; a review article. **Middle East journal of digestive diseases**, v. 10, n. 3, p. 133, 2018.

ECKERT, Christoph *et al.* The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 179, 2015.

FÉNELON, Mathilde *et al.* Human amniotic membrane for guided bone regeneration of calvarial defects in mice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 6, p. 78, 2018.

GIMENES, Fernanda Raphael Escobar *et al.* Nursing Assessment Tool for People With Liver Cirrhosis. **Gastroenterology Nursing**, v. 39, n. 4, p. 264-272, 2016.

GUILLOT, A.; TACKE, F. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights **Hepatology Communications**, v. 3, n. 6, p. 730-743, 2019

JU, Cynthia; TACKE, Frank. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. **Cellular & molecular immunology**, v. 13, n. 3, p. 316, 2016.

KAR, I. B. *et al.* Repair of oral mucosal defects with cryopreserved human amniotic membrane grafts: prospective clinical study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 11, p. 1339-1344, 2014.

KOO, Sue-jie; GARG, Nisha J. Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. **Redox Biology**, v. 24, 2019.

KRENKEL, Oliver *et al.* Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis. **Hepatology**, v. 67, n. 4, p. 1270-1283, 2018.

KUBO, Shoji *et al.* Previous or occult hepatitis B virus infection in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma without hepatic fibrosis. **Digestive diseases and sciences**, v. 46, n. 11, p. 2408-2414, 2001.

KUBO, S. *et al.* Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Liver Fibrosis in Rats. **Transplantation Direct**, v.1, n.4, p. 1-9, 2015.

LI, HAI *et al.* Hepatic macrophages in liver fibrosis: pathogenesis and potential therapeutic targets. **BMJ open gastroenterology**, v. 3, n. 1, p. e000079, 2016.

LI, Melissa K.; CRAWFORD, James M. The pathology of cholestasis. In: **Seminars in liver disease**. Copyright© by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2004. p. 21-42, 2004.

LIU, Baoding. Uncertain risk analysis and uncertain reliability analysis. **Journal of Uncertain Systems**, v. 4, n. 3, p. 163-170, 2010.

LUO, X.Y. *et al.* Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 16, 2019.

MAMEDE, Ana Catarina *et al.* Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. **The Journal of membrane biology**, v. 247, n. 4, p. 357-360, 2014.

MAMEDE, Karina M.; SANT'ANNA, Luciana B. Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.

MANUELPIILLAI, Ursula *et al.* Human amniotic epithelial cell transplantation induces markers of alternative macrophage activation and reduces established hepatic fibrosis. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38631, 2012.

MAYMÓ, Julieta L. *et al.* Proliferation and survival of human amniotic epithelial cells during their hepatic differentiation. **PloS one**, v. 13, n. 1, p. e0191489, 2018.

MOSSER, David M.; EDWARDS, Justin P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology**, v. 8, n. 12, p. 958, 2008.

MOHAMED, Hoda E. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells effectively regenerate fibrotic liver in bile duct ligation rat model. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 6, p. 581-591, 2016.

MURPHY, S. V. *et al.* Human amnion epithelial cells do not abrogate pulmonary fibrosis in mice with impaired macrophage function. **Cell Transpl**, v. 21, n. 7, p. 1477-1492, 2012.

NADER, L. A.; MATTOS, A. A.; BASTOS, G. A. N. Burden of liver disease in Brazil. **Liver International**, v. 34, n. 6, p. 844-849, 2014.

NIKNEJAD, Hassan *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur Cells Mater**, v. 15, p. 88-99, 2008.

PAROLINI, Ornella *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

RAMACHANDRAN, Prakash; IREDALE, John P.; FALLOWFIELD, Jonathan A. Resolution of liver fibrosis: basic mechanisms and clinical relevance. **Seminars in liver disease**, v. 35, n. 2, p. 119-131, 2015.

REILLY, Debra Ann *et al.* Clinical experience: using dehydrated human amnion/chorion membrane allografts for acute and reconstructive burn care. **Annals of plastic surgery**, v. 78, n. 2, p. S19-S26, 2017.

SATO, Keisaku *et al.* Pathogenesis of Kupffer cells in cholestatic liver injury. **The American journal of pathology**, v. 186, n. 9, p. 2238-2247, 2016.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Amniotic Membrane Application Reduces Liver Fibrosis in a Bile Duct Ligation Rat Model. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 441-453, abr. 2011.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Antifibrotic effects of human amniotic membrane transplantation in established biliary fibrosis induced in rats. **Cell transplantation.**, v. 25, n. 12, p. 2245-2257, 2016.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. **Braz J Med Biol Res.**, v. 50, n. 7, p. 1-12, 2017.

SEIFELDIN, A. *et al.* Vaginal wall repair—using amniotic membrane graft. **Obstet Gynecol Int J**, v. 2, n. 5, p. 00056, 2015.

SHETTY, Sonia S.; CHATTERJEE, Anirban; BOSE, Somik. Bilateral multiple recession coverage with platelet-rich fibrin in comparison with amniotic membrane. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 1, p. 102, 2014.

SILINI, Antonietta *et al.* Soluble factors of amnion-derived cells in treatment of inflammatory and fibrotic pathologies. **Current stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 6-14, 2013.

SILINI, Antonietta R. *et al.* Is immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine?. **Cell transplantation**, v. 26, n. 4, p. 531-539, 2017.

SILINI, A. R. *et al.* The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 2015.

SUN, Mengxi; KISSELEVA, Tatiana. Reversibility of liver fibrosis. **Clinics and research in hepatology and gastroenterology**, v. 39, p. S60-S63, 2015.

TAG, Carmen G. *et al.* Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 96, p. e52438, 2015.

TAN, J. L. *et al.* Human amnion epithelial cells mediate lung repair by directly modulating macrophage recruitment and polarization. **Cell Transpl** v. 23, n.3, p. 319-328, 2014.

TACKE, Frank; ZIMMERMANN, Henning W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1090-1096, 2014.

TSUNO, Hiroaki *et al.* Intraoral application of hyperdry amniotic membrane to surgically exposed bone surface. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 117, n. 2, p. e83-e87, 2014.

XU, Yejin *et al.* Interleukin 10 Gene-Modified Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Attenuate Liver Fibrosis in Mice by Inducing Regulatory T Cells and Inhibiting the TGF- β /Smad Signaling Pathway. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.

WERMUTH, Peter J.; JIMENEZ, Sergio A. The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases. **Clinical and translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 2, 2015.

WOLBANK, Susanne *et al.* Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Tissue engineering**, v. 13, n. 6, p. 1173-1183, 2007.

YANG, Ju Dong *et al.* Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 64-70, 2011.

ZIMMERMANN, Henning W.; TRAUTWEIN, Christian; TACKE, Frank. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 1-18, 2012.

ZOU, An *et al.* Hepatocyte nuclear receptor SHP suppresses inflammation and fibrosis in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 22, p. 8656-8671, 2018.