

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA**

**IMPACTO DA INFUSÃO INTRAPORTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO DE CIRROSE
INDUZIDA EM RATOS**

LUCAS SPADARI MAGGIONI

PORTO ALEGRE

2009

LUCAS SPADARI MAGGIONI

**IMPACTO DA INFUSÃO INTRAPORTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO DE CIRROSE
INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade Medicina e Ciências da Saúde - Área de concentração Clínica Médica - da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Denise Cantarelli Machado

Co-Orientador: Dr. Carlos Kupski

Porto Alegre

2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M193i Maggioni, Lucas Spadari

Impacto da infusão intraportal de células mononucleares de medula óssea em modelo de cirrose induzida em ratos / Lucas Spadari Maggioni. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

75p.: il. tab.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Kupski

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. TERAPIA CELULAR. 2. CIRROSE HEPÁTICA. 3. LEUCÓCITOS MONONUCLEARES. 4. MEDULA ÓSSEA. 5. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO. 6. VEIA PORTA. 7. DUCTO COLÉDOCO. 8. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 9. RATOS WISTAR. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Kupski, Carlos. III. Título.

616.853

C.D.D.
C.D.U. 616.36-004:616.419-089.84(043.3)
N.L.M. WI 725

*Dedico este trabalho ao meu amor
Julia, por estar sempre ao meu lado
nesta caminhada, não me deixar
desistir nos momentos mais difíceis,
aguentar os dias de mau humor e
acima de tudo me fazer muito feliz.*

AGRADECIMENTOS

Os meus pais, Ivori e Marlene, e minhas irmãs, Adriana e Rochane, pelo apoio incondicional em todas as etapas de minha vida e por terem participado como exemplo em minha formação pessoal e acadêmica.

A minha orientadora, Dra. Denise Cantarelli Machado, por sua tranquilidade, compreensão e competência durante esta longa etapa.

Ao meu co-orientador, Dr. Carlos Kupski, pelo auxílio e participação em todas as etapas deste trabalho, além de servir como modelo profissional de integridade e ética.

Ao biólogo Christian Viezzer por ter contribuído de maneira imprescindível na realização de todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Jurandi Bettio que, com sua habilidade única, tornou possível a injeção celular planejada.

Ao Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pela disponibilidade e interesse na realização da análise bioquímica.

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva e ao acadêmico de medicina Felipe Loss pelo apoio na elaboração das imagens e realização da análise das amostras do tecido hepático.

À Dra. Myriam Moretto pelo apoio nas dificuldades e ajuda nas infundáveis correções.

Ao Dr. Jefferson Braga da Silva por disponibilizar o Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, além de suas valiosas sugestões.

Ao Dr. Mario Wagner pela colaboração na análise estatística.

À Dra. Norma Marroni pela contribuição no desenvolvimento do modelo de cirrose.

Ao técnico em histologia, Tiago Giuliani Lopes, por tornar possível a realização da parte histológica deste trabalho.

Ao funcionário do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica da PUCRS, Gilmar Pontes Moreira, pelo auxílio na realização das cirurgias e cuidados com os animais.

RESUMO

Introdução: O único tratamento curativo disponível atualmente para pacientes cirróticos é o transplante hepático. Existem, entretanto, limitações na aplicação desta terapêutica, tornando necessário o desenvolvimento de novos métodos. Evidências crescentes têm demonstrado que o transplante de células-tronco pode tornar-se uma terapia eficaz em hepatopatias crônicas. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial do transplante intraportal de células mononucleares de medula óssea em modelo de cirrose induzida em ratos.

Metodologia: Vinte e quatro ratos Wistar fêmeas, quatorze dias após a ligadura de ducto biliar comum, foram randomizados para realização de transplante de 1×10^7 células mononucleares de medula óssea de ratos Wistar machos ou infusão salina através da veia porta, orientada por ecografia. No 28º dia do experimento os ratos foram sacrificados, com quantificação de albumina, bilirrubinas e aminotransferases séricas, além da aferição quantitativa da área de fibrose hepática através do picrossírius e identificação das células derivadas da medula óssea com a realização de imunohistoquímica com Anti-Sox 18.

Resultados: Após o transplante verificou-se forte repovoamento hepático com células da medula óssea do doador em 75% dos ratos. Houve redução significativa da área de fibrose no grupo da terapia celular ($P=0,036$), sem alteração nos parâmetros bioquímicos. Quando, entretanto, avaliaram-se os grupos pela incorporação de células da medula óssea, além da redução da fibrose ($P=0,043$) houve aumento dos níveis séricos de albumina ($P=0,008$) no grupo que apresentou repopulação.

Conclusão: O transplante intraportal de células mononucleares de medula óssea pode ser uma terapêutica eficaz para repopulação hepática, redução da fibrose e aumento da albumina sérica, podendo torna-se alternativa para o tratamento de cirrose em humanos.

ABSTRACT

Introduction: The only curative treatment currently available for cirrhotic patients is liver transplantation. However, there are limitations with this treatment, making necessary the development of new methods. Accumulating evidence indicates that stem cell transplantation is therapeutically effective in chronic liver diseases. The objective of this study was to evaluate the potential of intraportal transplantation of bone marrow mononuclear cells in an induced cirrhosis model in rats.

Methods: Twenty-four female *Wistar* rats, 14 days after ligation of the common bile duct were randomized to perform a transplantation of 1×10^7 mononuclear cells from bone marrow obtained from male *Wistar* rats or saline infusion by the portal route, guided by echography. On the 28th day of the experiment, the rats were sacrificed and serum albumin, bilirubin and aminotransferases were quantified. The area of hepatic fibrosis was determined by picosirius red staining, and the identification of cells derived from male bone marrow was performed by immunohistochemical staining with anti-Sox 18 antibody.

Results: After transplantation, a strong hepatic repopulation with cells from the donor bone marrow was detected in 75% of the treated rats. There was a significant reduction in the area of fibrosis in the cell therapy group ($P=0.036$), without alteration in the biochemical parameters. However, when evaluating the group showing incorporation of bone marrow cells, besides a reduction in fibrosis ($P=0.043$), there was an increase in serum albumin levels ($P=0.008$).

Conclusion: Intraportal transplantation of mononuclear bone marrow cells can be an effective treatment for hepatic repopulation, reduction of fibrosis, and increase in serum albumin, making this a potential alternative therapy for human cirrhosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - Alanino aminotransferase
AST - Aspartato aminotransferase
CDTC - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CMO - Células de medula óssea
CMMO - Células mononucleares de medula óssea
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPEA - Coordenação de Produção e Experimentação Animal
Cr - Creatinina
CTP - *Child-Turcotte-Pugh*
CTA - Células-tronco adultas
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMLU - Departamento Municipal de Limpeza Urbana
EGF - Fator de crescimento epidérmico
FA - Fosfatase alcalina
FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GGT - Gama glutamil transpeptidase
HCV - Vírus da hepatite C
HGF - Fator de crescimento de hepatócitos
MEC - Matriz extracelular
MELD - *Model for End-Stage Liver Disease*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBS - Solução tampão fosfato/salina
PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SUS - Sistema Único de Saúde
STF - Superior Tribunal Federal
TGF- α - Fator de crescimento transformante alfa
TGF- β - Fator de crescimento transformante beta
TIPS - *Shunt* porto-sistêmico transjugular
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UNOS - *United Network for Organ Shearing*
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial
 α -SMA - Actina de músculo liso alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de fibrose em ratos Wistar com cirrose induzida submetidos ao tratamento com células mononucleares de medula óssea e animais controle, determinado pela técnica de picrossirius.....	40
Tabela 2 - Resultado das análises quantitativas dos parâmetros bioquímicos em ratos Wistar com cirrose induzida submetidos ao tratamento com células mononucleares de medula óssea e animais controle.....	40
Tabela 3 - Comparação por incorporação celular das variáveis histológicas e bioquímicas em ratos Wistar com cirrose induzida.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações vasculares e arquiteturais na cirrose	14
Figura 2 - Mediadores parácrinos mais importantes que ativam as células estreladas.....	16
Figura 3 - Embrião humano na fase de blastocisto, do qual se extraem as células-tronco embrionárias	21
Figura 4 - Fluxograma do desenho experimental	31
Figura 5 - Cirurgia para ligadura biliar.....	32
Figura 6 - Histograma mostrando o número de eventos e a intensidade de fluorescência (FITC) para (A) CD45, (B) CD49b, (C) CD90.	38
Figura 7 - Fotomicrografia de fígado de ratos mostrando a marcação para Sox-18 pela técnica de imunohistoquímica	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 CIRROSE	13
2.1.1 Definição	13
2.1.2 Epidemiologia	14
2.1.3 Fisiopatogenia	15
2.1.4 Evolução e prognóstico	17
2.1.5 Transplante hepático.....	19
2.2 CÉLULAS-TRONCO	20
2.2.1 Conceito.....	20
2.2.2 Células-tronco embrionárias	20
2.2.3 Células-tronco adultas	22
2.2.4 Células-tronco e fígado	25
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS.....	28
4.1 OBJETIVO GERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	29
5.2 ÉTICA	29
5.3 ANIMAIS	29
5.4 ANESTESIA E ANALGESIA	30
5.5 EUTANÁSIA	30
5.6 DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
5.7 INDUÇÃO DE CIRROSE	32

5.8	PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	32
5.9	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS POPULAÇÕES PRESENTES NA INFUSÃO USADA NO GRUPO TRATADO.....	33
5.10	TÉCNICA PARA INJEÇÃO CELULAR.....	34
5.11	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	34
5.12	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO.....	34
5.13	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	35
5.14	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	35
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6	RESULTADOS.....	37
6.1	ANIMAIS.....	37
6.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR TRANSPLANTADA.....	37
6.3	ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE CÉLULAS PROVENIENTES DO ANIMAL DOADOR NO TECIDO HEPÁTICO.....	38
6.4	COMPARAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA APÓS TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	39
6.5	ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS.....	40
6.6	COMPARAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS.....	41
7	DISCUSSÃO.....	42
8	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXOS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A cirrose é um processo difuso do fígado, caracterizado por fibrose e conversão da arquitetura normal em nódulos estruturalmente anormais, associado a alterações hemodinâmicas na circulação portal, com hipertensão portal e disfunção hepática (1).

Embora sua prevalência seja subestimada, já que são característicos longos períodos assintomáticos, estima-se que 0,15% da população americana apresente cirrose (2), sendo uma das principais causas de morte no mundo (3).

A fibrogênese hepática é desencadeada por vários estímulos, principalmente os vírus, o álcool e as doenças metabólicas, culminando em alterações celulares e humorais que ativarão as células estreladas com conseqüente alteração da matriz extracelular (1). O resultado final destas alterações é o desenvolvimento de complicações como ascite, sangramento gastrointestinal, encefalopatia e icterícia, caracterizando a descompensação da doença hepática. Pacientes cirróticos apresentam transição do estágio compensado para o descompensado em uma taxa aproximada de 5 a 7% ao ano, com uma sobrevida média de dois anos após a primeira descompensação, tornando necessária a aplicação de tratamentos efetivos (4).

O único tratamento curativo disponível até o momento é o transplante hepático. Taxas de sobrevida em cinco anos de 70% tornariam o transplante a solução ideal, porém, o aumento significativo de pacientes em lista de espera, pela escassez de doadores, e mortalidade em torno de 50% enquanto listados, trouxeram a necessidade de terapêuticas alternativas. Neste contexto surge o interesse pelo estudo das células-tronco.

As células-tronco apresentam capacidade de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares, podendo representar a solução para este problema. Estudos como o de Lagasse, em 2000, e o de Sakaida, em 2004, têm demonstrado não somente a diferenciação de células-tronco em hepatócitos como também a funcionalidade destas células quando transplantadas, contribuindo para a melhora do órgão.

Existem, porém, várias questões a respeito do mecanismo de ação, segurança e eficácia que necessitam ser respondidas, vislumbrando um longo caminho a ser percorrido antes da aplicabilidade clínica assistencial.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CIRROSE

2.1.1 Definição

O termo cirrose e a patologia que ele define, vêm sendo tema de debate e polêmica desde o início do século XX. Este termo foi introduzido pela primeira vez por Laennec em 1819, no seu *Traité de l'Auscultation*, considerando as granulações encontradas no tecido hepático como neoformações e, devido à coloração apresentada pelo fígado, denominou tal condição de cirrose, já que *kirros* em Grego significa amarelo (5).

Consensos foram realizados para reconhecer que a cirrose é mais que uma fibrose disseminada do fígado. Em 1978 a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu cirrose como um processo difuso, caracterizado por fibrose e conversão da arquitetura normal do fígado em nódulos estruturalmente anormais. Implícita nesta definição morfológica está uma importante alteração hemodinâmica, que consiste no estabelecimento de *shunts* vasculares intra-hepáticos, entre vasos aferentes (veia porta e artéria hepática) e eferentes (veia hepática) do fígado (6). A distorção vascular causada por estes *shunts* compromete a relação entre os sinusóides hepáticos e os hepatócitos. O preenchimento do espaço de Disse por tecido cicatricial faz com que as fenestrações endoteliais sejam perdidas, processo conhecido por capilarização sinusoidal (Figura 1). Estas alterações culminam nas principais consequências clínicas da cirrose, que são a disfunção hepática e o aumento da resistência intra-hepática (hipertensão portal).

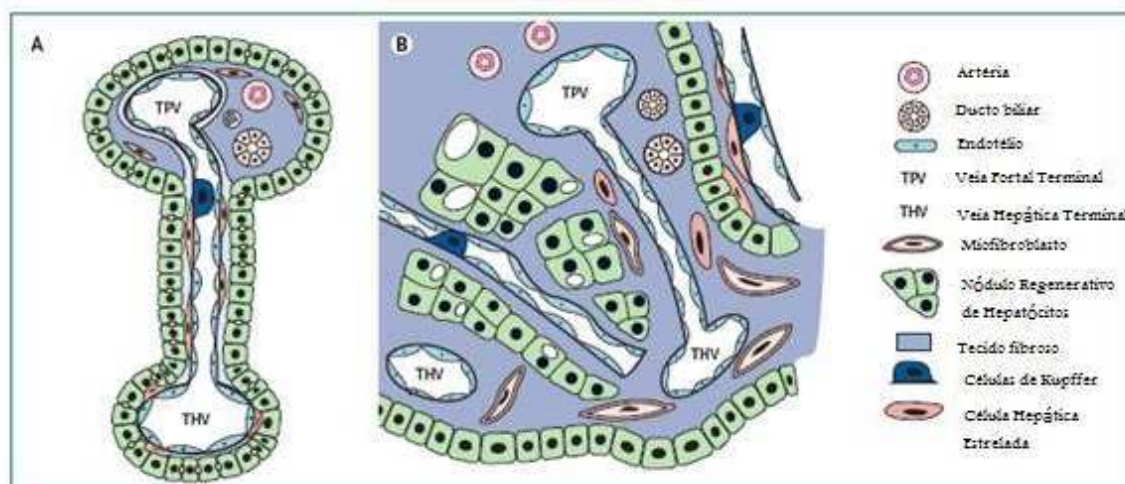


Figura 1 - Alterações vasculares e arquiteturais na cirrose
 Fonte: Schuppan *et al* (2).

Nota: Fluxo sanguíneo mesentérico via veia porta e artéria hepática que se estende para trato portal terminal. (A) Fígado sadio: trato portal terminal onde o sangue flui através dos sinusóides hepáticos que apresentam fenestrações endoteliais sob o espaço de Disse, permitindo a troca metabólica com os hepatócitos lobulares; sangue sinusoidal é coletado pelas vênulas hepáticas terminais que desemboca em uma das três veias hepáticas e finalmente na veia cava. (B) Fígado cirrótico: miofibroblastos ativados que derivam das células estreladas hepáticas e fibroblastos portais ou da veia centrolobular e produzem excesso de matriz extracelular (MEC). Este evento leva a expansão fibrosa portal, fibrose da veia centrolobular e capilarização dos sinusóides, caracterizado pela perda das fenestrações endoteliais, congestão do espaço de Disse com MEC e reparação das ilhotas de hepatócitos perisinusoidais do fluxo sanguíneo sinusoidal por septos colagenosos. O sangue apresenta *shunt* da veia porta terminal e artérias para a veia centrolobular, com conseqüente hipertensão porta e comprometimento da função de síntese hepática.

2.1.2 Epidemiologia

A exata prevalência da cirrose não é conhecida. Estima-se que 0,15% da população americana apresente cirrose, sendo responsável por mais de 25.000 mortes e 373.000 hospitalizações, sendo a 12ª causa de morte nos Estados Unidos da América (7). Mundialmente, segundo estimativas da OMS, a cirrose é responsável por 800.000 mortes anuais (8). Nota-se, entretanto, uma tendência mundial de declínio na mortalidade por cirrose, em taxas que variam de 1,5% a 5%, explicada pela redução da prevalência dos principais fatores etiológicos (9). Estes números provavelmente são subestimados, já que a cirrose compensada pode permanecer indetectável por longo período de tempo.

As principais causas de cirrose em países ocidentais são a hepatite C e a doença hepática alcoólica; na Ásia e na África a hepatite B é a causa mais prevalente. Após a identificação do vírus da hepatite C (HCV) em 1989 e da esteatohepatite não alcoólica em pacientes obesos e

diabéticos, o diagnóstico de cirrose sem causa aparente (cirrose criptogênica) raramente é feito. A identificação da causa da cirrose torna-se importante no momento em que o diagnóstico etiológico pode prever o prognóstico e guiar decisões terapêuticas (2).

2.1.3 Fisiopatogenia

A fibrose hepática é uma resposta de reparação desencadeada por várias causas, incluindo vírus, doenças autoimunes, metabólicas, colestáticas e tóxicas, onde as regiões danificadas são encapsuladas por matriz extracelular (MEC). A fibrogênese hepática é um processo complexo, composto por uma sequência de eventos, incluindo infiltração de células inflamatórias, apoptose de hepatócitos e proliferação de células mesenquimais produtoras de matriz, associado a um aumento no acúmulo dos componentes da MEC, incluindo colágeno tipo I e II (1).

O centro do evento fibrogênico é a ativação das células estreladas. No fígado normal as células estreladas compõem aproximadamente 1,4% do volume total do fígado, num índice de 3,6 a 6 células por 100 hepatócitos e tipicamente estão localizadas no espaço perisinusoidal de Disse. Em seu estado quiescente apresenta depósitos citoplasmáticos de lipídios que servem como principal depósito de vitamina A, apresentando papel fundamental na homeostase do ácido retinóico; também é indispensável para manutenção estável dos níveis de matriz da membrana basal nos sinusóides hepáticos, regulando o fluxo sanguíneo e a pressão venosa portal (10). A ativação é a transdiferenciação da célula em um miofibroblasto ativo e ocorre em duas fases, uma fase de iniciação, também chamada pré-inflamatória, e outra fase de perpetuação.

A iniciação se refere a mudanças na expressão dos genes e do fenótipo, que tornam a célula responsiva a vários fatores de crescimento. A indução rápida do receptor beta, do fator de crescimento derivado das plaquetas, o desenvolvimento de fenótipo contrátil e fibrogênico e a modulação da sinalização dos fatores de crescimento são as alterações cardinais desta resposta inicial (11). Os estímulos parácrinos são gerados por todas as células relacionadas às células estreladas, incluindo células de Kupffer, hepatócitos, leucócitos e endotélio sinusoidal (Figura 2). Dentre estas células, a infiltração das células de Kupffer tem papel relevante. Há coincidências com o influxo destas células e o aparecimento de marcadores de ativação das células estreladas com a alfa actina de músculo liso (α -SMA). As células de Kupffer estimulam a proliferação, a síntese de matriz e a liberação de retinóides pelas células estreladas hepáticas, através da ação de

citocinas como fator de crescimento (TGF)- β e o fator de necrose tumoral (TNF)- α , além da geração de espécies de oxigênio reativo no fígado, que são capazes de potencializar a ativação e síntese de colágeno pelas células estreladas (12).

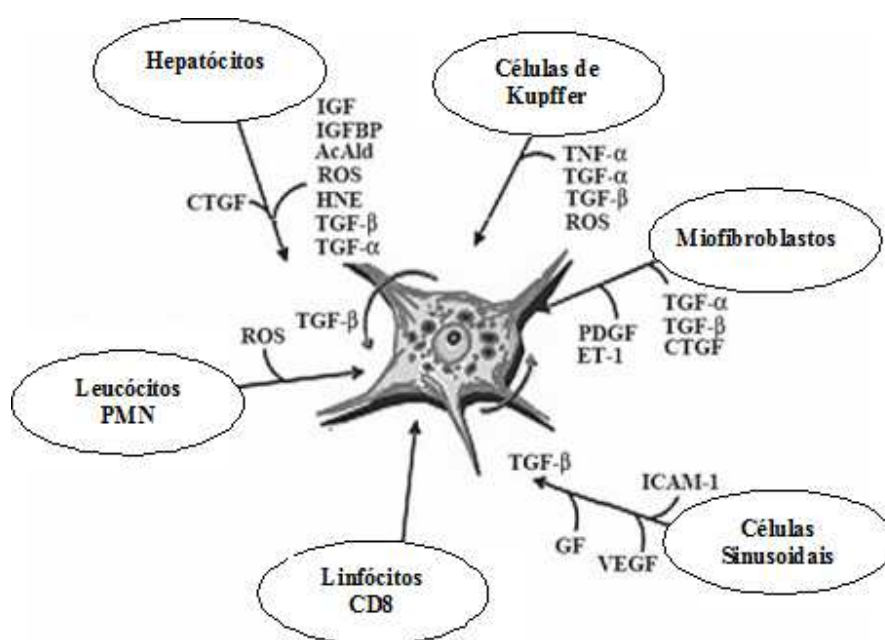


Figura 2 - Mediadores parácrinos mais importantes que ativam as células estreladas.

Fonte: Li *et al.* (12)

Nota - IGF: fator de crescimento *insulina-like*; IGFBP: proteína ligadora do IGF; ROS: espécies de oxigênio reativo; HNE: hidroxinonenal; TGF: fator de crescimento transformador; TNF: fator de necrose tumoral; PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas; ET: endotelina; CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo; GF: fator de crescimento; ICAM: molécula de adesão intercelular; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial.

A perpetuação resulta no efeito destes estímulos na manutenção do genótipo e do fenótipo ativado, envolvendo ao menos sete fatores: proliferação, quimiotaxia, fibrogênese, contratilidade, degradação da matriz, perda retinóide e liberação de citocinas por leucócitos. O efeito destas alterações, direta ou indiretamente, é o aumento do acúmulo da MEC (13).

A MEC se refere ao arranjo de macromoléculas que compõem o esqueleto do fígado normal e do fígado fibrótico. Os componentes da MEC incluem diversas famílias de moléculas estruturais e de suporte como colágenos, glicoproteínas não colágenas, fatores de crescimento ligados à matriz, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas matricelulares. O fígado fibrótico é caracterizado por diferenças qualitativas e quantitativas na composição da matriz. O conteúdo total de colágeno aumenta de 3 a 10 vezes, entretanto sem apresentar alteração na sua

sequência ou estrutura, ocorrendo um aumento significativo na matriz intersticial que é típica na reparação do dano, como fibras de colágeno tipo I, III e IV (14).

A MEC apresenta uma função reguladora dinâmica. Inicialmente o acúmulo de matriz subendotelial leva a capilarização do espaço de Disse. Os componentes da membrana basal com o espaço subendotelial são essenciais para preservação da função dos hepatócitos, das células estreladas e das células endoteliais. A substituição da matriz normal de baixa densidade pela matriz intersticial de alta densidade perturba diretamente a função dos hepatócitos e explica a disfunção sintética e metabólica que é característica da cirrose. A matriz de alta densidade também ativa as células estreladas e leva a uma diminuição na fenestração das células endoteliais sinusoidais, alterando o transporte de solutos dos sinusóides para os hepatócitos. A MEC também afeta indiretamente a função celular através da liberação de fatores de crescimento solúveis, como o fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento de hepatócitos, o fator de crescimento de tecido conjuntivo, o fator de necrose tumoral α , o fator de crescimento de células endoteliais vasculares, entre outros. A liberação controlada destas citocinas pela MEC é um mecanismo fundamental para manter a sua atividade, pois gera uma fonte local e acessível que é regulada pela ação das proteases e seus inibidores (15).

A degradação da MEC representa um componente importante da fibrose hepática, já que a ruptura precoce da matriz hepática normal pelas proteases (degradação patológica da matriz) leva à formação de uma matriz cicatricial, que apresenta efeitos deletérios na função celular, e que a reabsorção urgente do excesso de matriz, em estados de fibrose estabelecida nos pacientes com hepatopatias crônicas (degradação terapêutica da matriz) através de citocinas como as metaloproteinases de matriz, poderia levar a uma reversão da disfunção hepática e da hipertensão portal (16).

2.1.4 Evolução e prognóstico

A história natural é caracterizada por uma fase assintomática, denominada cirrose compensada, e por uma fase rapidamente progressiva, marcada pelo desenvolvimento de complicações relacionadas à hipertensão portal e à insuficiência hepática, denominada cirrose descompensada. À medida que a doença progride, ocorre o aumento da pressão portal e diminuição da função hepática, resultando no surgimento de ascite, sangramento gastrointestinal,

encefalopatia e icterícia, todos marcos da transição de estágio compensado para descompensado. A progressão pode ser acelerada pelo desenvolvimento de outras complicações como ressangramento, insuficiência renal, síndrome hepatopulmonar e sepse (4).

A transição do estágio compensado para o descompensado ocorre em uma taxa aproximada de 5 a 7% ao ano. Esta mudança representa um marco importante na expectativa de vida dos cirróticos. Pacientes com cirrose compensada apresentam uma sobrevida média maior que 12 anos, ao passo que os com descompensação têm sobrevida estimada em 2 anos (4).

A definição do prognóstico de cada paciente cirrótico é, portanto, parte importante da avaliação, por ter influência direta na escolha da terapêutica. Vários escores prognósticos foram desenvolvidos com a finalidade de determinar a função hepática e a evolução da cirrose. Os principais são a classificação de Child-Turcotte-Pugh (CTP) e o *Model for End-Stage Liver Disease* (MELD).

O CTP, que foi definido empiricamente, é baseado na albumina sérica, bilirrubina, tempo de protrombina, ascite e encefalopatia. Apesar de popular e do uso frequente, metodologicamente sofre de várias fraquezas. Inicialmente a escolha das variáveis foi definida pela experiência clínica dos autores, sem realização de validação estatística. O uso de pontos de corte para albumina, bilirrubina e protrombina reduzem artificialmente o valor prognóstico de cada variável. O risco de morte não é proporcional nas diferentes categorias. As cinco variáveis não são igualmente importantes na prática, há margem para interpretação subjetiva de variáveis como ascite e encefalopatia. Outras variáveis importantes como varizes esofágicas, hemorragia digestiva alta por varizes e creatinina não são consideradas. Deste modo, o CTP torna-se um preditor sem boa acurácia para avaliação da função hepática e sobrevida (17).

O MELD é um modelo matemático que usa logaritmos da creatinina, bilirrubina e da protrombina. Foi desenvolvido em 2000, inicialmente para uso em pacientes cirróticos, após a realização de *shunt* porto-sistêmico transjugular (TIPS), com o objetivo de prever a sobrevida e o risco de morte em três meses. Posteriormente foi validado para prever mortalidade em três meses para todos os pacientes cirróticos. Seu principal defeito é que variáveis importantes como encefalopatia porto-sistêmica e hipertensão portal podem ter sido desconsideradas por problemas metodológicos no seu desenvolvimento (18).

Em 2005 foi publicado o Consenso de Baveno IV, realizado na Itália no mesmo ano, com o objetivo de discutir a metodologia do diagnóstico e tratamento da hipertensão portal. Foram

definidos quatro estágios clínicos de características e prognósticos distintos: o estágio um é caracterizado pela ausência de varizes de esôfago e ascite e apresenta uma mortalidade estimada de 1% por ano; o estágio dois, com presença de varizes esofágicas sem sangramento ou ascite, apresentando uma mortalidade estimada de 3,4% ao ano; o estágio três é definido pelo surgimento de ascite e com mortalidade de 20% ao ano; o estágio quatro é caracterizado por hemorragia digestiva e com mortalidade anual de 57% ao ano. A progressão de um estágio para outro ocorre em uma taxa aproximada de 7% ao ano. Os pacientes com cirrose descompensada estão nos estágios três e quatro (19).

A alta mortalidade apresentada por pacientes nos estágios três e quatro levou à busca de tratamentos mais efetivos no controle da doença. O uso de diuréticos para o manejo da ascite, a profilaxia medicamentosa e endoscópica do sangramento digestivo por varizes esofágicas, o uso de antibióticos profiláticos e terapêuticos e o rastreamento para detecção precoce do carcinoma hepatocelular, trouxeram apenas um pequeno aumento no tempo de sobrevivência.

2.1.5 Transplante hepático

O transplante hepático é o único tratamento curativo disponível atualmente. Taxas de sobrevivência em um ano maior que 85%, em três anos em torno de 75% e em cinco anos de 70% (20), fizeram com que esta terapêutica entusiasmasse médicos e pacientes, com expectativas de vida muito maiores em relação à evolução natural da doença.

O grande problema deste tratamento reside na escassez de órgãos doados. Dados da *United Network for Organ Sharing* (UNOS), órgão americano responsável pela regulação de todo sistema de transplante, revelam que em 2008 havia 15.929 pacientes em lista de espera e somente 4.752 transplantes hepáticos foram realizados. A consequência desta desproporção entre pacientes necessitando de transplante hepático e o número de transplantes realizados é um tempo de espera que pode chegar a 106 dias para pacientes com MELD entre 19 e 24 e 641 dias quando o MELD está entre 11 e 18, com uma mortalidade em lista de espera de aproximadamente 40-50%. No Brasil a realidade não é diferente; segundo o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, no primeiro semestre de 2008 foram realizados 533 transplantes de fígado, enquanto havia 6505 pacientes em lista de espera (21).

Pelos motivos citados como a escassez de órgãos, a alta mortalidade em lista de espera, o custo elevado do transplante, a dificuldade de acesso ao Sistema Único de Saúde (SUS), entre outros, há necessidade de alternativas terapêuticas efetivas para estes pacientes, que possam mudar a evolução da cirrose ou proporcionar maior sobrevida enquanto aguardam a oportunidade da realização de transplante. É neste contexto que se fortalecem as pesquisas com células-tronco.

2.2 CÉLULAS-TRONCO

2.2.1 Conceito

Células-tronco são definidas como células clonogênicas, que apresentam capacidades de auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Estas células estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento e provavelmente existem em todos os organismos multicelulares (22).

Durante a embriogênese um simples oócito fertilizado origina um organismo multicelular, no qual as células e tecidos adotam características e funções diferentes e específicas. Durante o desenvolvimento embrionário as células que adquiriram determinadas características proliferam, permitindo que tecidos e órgãos se desenvolvam. Mesmo após o término do desenvolvimento, vários órgãos e tecidos mantêm um processo de homeostase, nos quais as células mortas, por apoptose ou injúria, são substituídas. Todos estes processos celulares são resultados diretos da presença de células-tronco (23).

2.2.2 Células-tronco embrionárias

As primeiras linhagens de células-tronco embrionárias humanas foram desenvolvidas em 1998 pelo pesquisador americano James Thomson, embora já houvesse descrição destas células desde a década de 70, quando Leroy Stevens e Barry Pierce isolaram células de teratomas testiculares de camundongos (24).

Durante o desenvolvimento há uma diminuição progressiva do potencial de diferenciação das células do embrião. No estágio de blastocisto as células do trofoectoderma já estão comprometidas de forma irreversível com as linhagens extra-embrionárias, enquanto as células

da massa celular interna ainda possuem o potencial de gerar tecidos de todo o embrião. Células retiradas da massa celular interna podem continuar indiferenciadas, multiplicar-se indefinidamente e contribuir na formação de todos os tipos celulares dos três folhetos embrionários: o endoderma, o mesoderma e o ectoderma (Figura 3). Estas células quando mantidas em culturas, na presença de fatores tróficos, se mantêm indiferenciadas (autorenovação) e formam teratomas (tumores com células de todos os folhetos embrionários) quando injetadas sob a pele de camundongos imunodeficientes, demonstrando sua pluripotencialidade (25).

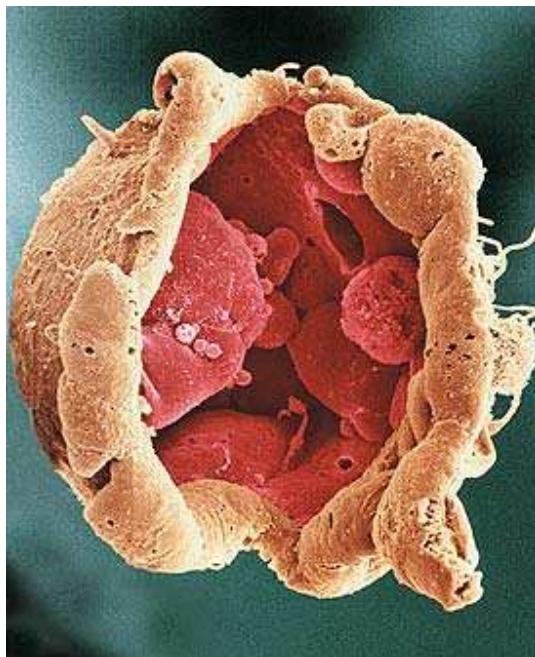


Figura 3 - Embrião humano na fase de blastocisto, do qual se extraem as células-tronco embrionárias.
Fonte: Copiado de <http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens>.

As células-tronco embrionárias para serem transplantadas necessitam de diferenciação *in vitro*, já que, como comentado anteriormente, em sua forma indiferenciada podem seguir um programa desorganizado de diferenciação, dando origem a tumores em vez do tecido terapêutico desejado.

Diversos estudos já foram realizados em modelos animais conseguindo-se diferenciação de CTE em células hematopoiéticas capazes de repopular a medula óssea de camundongos irradiados (26), gerando células produtoras de mielina (27), precursores neurais capazes de gerar *in vivo* astrócitos, oligodendrócitos e neurônios funcionantes (27), células produtoras de insulina

(28), músculo cardíaco (29) e neurônios dopaminérgicos capazes de aliviar os sintomas de um modelo animal de doença de Parkinson (30).

Hepatócitos também já foram gerados a partir de células-tronco embrionárias. Estas células hepáticas apresentaram alta atividade de remoção de amônia e secreção de albumina em cultura (31) e têm servido como base para desenvolvimento de fígados artificiais híbridos (32).

Ainda não existem protocolos clínicos que utilizem células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. A principal razão para isto é a questão de segurança das células. Em modelos animais mostrou-se que frequentemente, quando transplantadas, havia formação de teratomas ou teratocarcinomas no órgão-alvo. Existe também a questão ética envolvida, já que para obtenção destas células em humanos é obrigatória a destruição de embriões, inaceitável para algumas culturas e religiões.

No Brasil, a pesquisa e a terapia de células-tronco embrionárias foram permitidas através da Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105) de 24 de março de 2005 e confirmada pelo Superior Tribunal Federal (STF) em 28 de março de 2008, desde que sejam atendidas as condições de obtenção através de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não usados no procedimento, inviáveis, congelados há três anos ou mais e com consentimento dos progenitores.

2.2.3 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas (CTA) são indiferenciadas, responsáveis pela geração de células especializadas durante o processo de crescimento, diferenciação tecidual, renovação celular e reparação tecidual ao longo da vida. Elas são parte das células tecido-específica e possuem capacidade de autorenovação e diferenciação em tecidos celulares especializados ao sofrer processo de divisão celular (33).

Já se identificou CTA em vários tecidos diferenciados como medula óssea, córnea, retina, fígado, pele, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, coração e cérebro (34, 35). Elas são bastante raras e estima-se que uma em 10.000 células da medula óssea seja uma célula-tronco hematopoiética (23).

O paradigma clássico de que a diferenciação de uma CTA é restrita à linhagem de seu órgão específico tem mudado. Há possibilidade de manutenção nestas células de algum grau de plasticidade que permite seu desenvolvimento entre diferentes linhagens, tecidos e camadas

germinativas (36). Vários estudos já demonstraram que células não selecionadas da medula óssea, depois de transplantadas formaram tecido não linfohematopoético como fibras musculares (37), hepatócitos (38) e tecido neural (39). Os mecanismos que permitem a transdiferenciação das CTA ainda não são conhecidos e já existem estudos que questionam esta teoria, sugerindo que a fusão celular pode explicar os achados descritos anteriormente (40).

Tanto a plasticidade quanto a possibilidade de utilização autóloga destas células, além das questões ético-religiosas e de segurança envolvidas com as células-tronco embrionárias, tem feito das CTA motivo de intensa pesquisa.

Os principais tipos de CTA já identificados e caracterizados são células-tronco mesenquimais, células-tronco hematopoiéticas, pericitos, células-tronco cardíacas, células satélites, células-tronco neurais, células-tronco da pele e células ovas.

As células-tronco mesenquimais são encontradas no estroma de vários órgãos. Foi primeiramente descrita por Friedenstein e cols., em 1970, ao investigarem células componentes do estroma da medula óssea que podiam se diferenciar em vários tipos celulares como osteoblastos, condroblastos e adipócitos quando em cultura (41). Podem ser obtidas também da polpa dentária (42), do tecido adiposo, de tendões, sangue do cordão umbilical e placenta (43). A sua facilidade de obtenção a partir da medula óssea ou do tecido adiposo e posterior expansão *in vitro*, fazem com que as células-tronco mesenquimais sejam excelentes candidatas à utilização em terapias celulares. Já se conseguiu diferenciação destas células em tecido ósseo, neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos e células musculares, compreendendo os três folhetos germinativos (44-48).

As células-tronco hematopoiéticas são utilizadas na prática médica há mais de 40 anos para fins hematológicos e oncológicos. Enquanto seu potencial para geração de tecido hematopoiético já está bem demonstrado, o potencial de diferenciação em tipos celulares não-hematopoiéticos é bastante discutido. A discordância se dá porque em muitos trabalhos utilizaram-se populações celulares denominadas de células-tronco hematopoiéticas, mas na realidade foram usadas células da medula óssea, que contêm em maior ou menor proporção, populações diferentes de células-tronco, incluindo as células mesenquimais (49).

Os mecanismos de ação das CTA ainda são discutidos. Há evidências de que o principal mecanismo de atuação das células-tronco adultas não seja a formação de novos tipos celulares; sabe-se que elas são capazes de reconhecer sinais de dano tecidual e migrar para áreas de lesão

em vários órgãos e tecidos (50, 51). A melhora funcional após a terapia celular pode ser causada pela liberação de mediadores como citocinas e fatores de crescimento na área da lesão, que possuem efeitos imunossupressores ou apoptóticos, além de promover degradação de tecido fibroso, proliferação celular e estimular angiogênese (52).

O estudo das CTA em doenças cardiovasculares está em estágio avançado, com vários protocolos clínicos já realizados e publicados. Na doença coronariana aguda em 2001, na Alemanha, Bodo Strauer realizou injeção de células mononucleares de medula óssea por via intracoronariana com segurança em paciente após infarto agudo do miocárdio, seguido de uma série de 10 casos, nos quais se constatou melhora da contratilidade miocárdica na área infartada, além de redução de 18 % do volume sistólico final do ventrículo esquerdo e da redução da área com defeito de perfusão miocárdica em 26% (53). Seguidos a este foram realizados estudos randomizados de injeção de células mononucleares de medula óssea (CMMO) intracoronarianas (54-57), demonstrando aumento significativo da fração de ejeção, redução da área de infarto e melhor remodelamento cardíaco nos pacientes submetidos à terapia celular. Atribui-se este efeito benéfico à vasculogênese e à angiogênese, observadas em modelos experimentais, após a injeção intracoronariana de células-tronco, constatando-se, por outro lado, uma baixa miogênese. Já em outras doenças cardíacas como a miocardiopatia dilatada, os estudos clínicos desenvolvidos como o de Martino e cols., não têm demonstrado até o momento diferenças significativas obtidas com a terapia celular intracoronariana (58).

As células-tronco também vêm sendo consideradas como possíveis curas para doenças neurovasculares, neurodegenerativas e lesões traumáticas do sistema nervoso central (SNC). Estudos experimentais mostraram resultados animadores com uso de células-tronco em doenças como acidente vascular isquêmico (59, 60) e doença de Parkinson (30). A partir disto abriu-se espaço para aplicabilidade clínica, iniciando-se estudos de fase I e II. Tanto estudos de células-tronco não-autólogas como autólogas foram realizados para estudos de pacientes com acidente vascular isquêmico agudo (61-64), mostrando resultados animadores com melhor evolução neurológica e aumento do metabolismo cerebral nas áreas isquêmicas, sem maiores complicações relacionadas ao procedimento. Foram aplicadas terapias celulares também em pacientes com doenças crônicas como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, porém sem demonstração de eficácia (65-67).

2.2.4 Células-tronco e fígado

O fígado é um órgão com capacidade de regeneração já bem conhecida. Sabe-se que após hepatectomia parcial, por um mecanismo de hiperplasia compensatória, há recuperação da massa hepática perdida (68).

Por esta capacidade de regeneração foi levantada a hipótese do uso de transplante de hepatócitos e não de todo o órgão. Tal estratégia ofereceria inúmeras vantagens como a possibilidade de utilizar hepatócitos de um único doador para mais de um receptor, e uma menor morbidade por não necessitar de intervenção cirúrgica. O número de sistemas de cultura celular *in vitro*, entretanto, não se expandiu de forma suficiente para atender a demanda, levando tal estratégia ao desuso (69).

O interesse do uso de células-tronco para doenças hepáticas surgiu no momento em que foram identificados potenciais progenitores hepáticos dentro da medula óssea. Estas células poderiam ser ativadas em resposta à lesão hepática. Estudos identificaram o “tráfego” de células-tronco hematopoiéticas durante a injúria hepática (70).

Lagasse e colaboradores demonstraram que células-tronco hematopoiéticas poderiam originar hepatócitos em camundongos submetidos à injúria por irradiação e seriam capazes de sintetizar enzimas deficientes (71).

Sakaida e colaboradores, em 2004, investigaram o efeito do transplante de células-tronco na fibrose hepática em ratos. Após a indução de cirrose por tetracloreto de carbono, houve migração das células-tronco hematopoiéticas ao longo das fibras do tecido hepático. Verificou-se atividade gelatinolítica intensa na área periportal e quatro semanas após o transplante celular detectou-se redução significativa da fibrose (72).

Takeda e colaboradores, em 2005, em ratos com cirrose induzida, comprovaram que após o transplante de células-tronco hematopoiéticas, houve uma completa recuperação na produção de albumina (73).

Em outro estudo experimental, realizado por Sakaida, em 2005, verificou-se a repopulação hepática por células derivadas da linhagem de células-tronco do doador, se diferenciando em hepatócitos produtores de albumina, além do aumento da sobrevivência dos ratos submetidos ao transplante, como consequência da recuperação da função e diminuição da fibrose (74).

Terai e cols., em 2005, confirmaram a plasticidade de células-tronco hematopoiéticas pelos achados de autópsia de ratos fêmeas receptores de células provenientes de ratos machos. Acharam uma eficiente repopulação hepática com células derivadas do doador, consequente diminuição da fibrose e melhora da função (75).

Yokoyama e cols., em 2006, em cirrose induzida por tetracloreto de carbono em ratos, demonstram que o tratamento com células-tronco induziria a regeneração hepática, melhoraria a função e diminuiria a fibrose com consequente produção de albumina (76).

Já existem três estudos clínicos de fase I, que demonstram a segurança do transplante de células-tronco de medula óssea em pacientes cirróticos. Em todos os estudos não houveram complicações relacionadas à infusão celular e observou-se discreta melhora da função hepática dos pacientes (77-79).

Estes resultados corroboraram idéia de que o transplante de células-tronco apresenta potencial para se tornar o tratamento efetivo para pacientes com insuficiência hepática. Entretanto ainda não há uma definição que permita o uso em seres humanos, nem que identifique qual população de doentes com hepatopatias deva ser beneficiada com esta terapia como cirróticos ou os pacientes com insuficiência hepática aguda.

3 JUSTIFICATIVA

A cirrose hepática, por ser uma doença prevalente na população e estar entre as principais causas de morte no mundo, necessita de um tratamento efetivo que possibilite uma melhor qualidade de vida, maior sobrevivência e, idealmente, a cura dos pacientes. Atualmente a alternativa que mais se aproxima desta situação é o transplante hepático, porém com limitações como a escassez de órgãos, a alta complexidade, os custos elevados e as complicações relacionadas à imunossupressão no pós-operatório.

A terapia celular com células-tronco vem mostrando-se promissora em áreas da medicina como neurologia e cardiologia que já apresentam ensaios clínicos com resultados animadores. Nas hepatopatias existem estudos experimentais em quantidade crescente, entretanto os mecanismos de ação, segurança e eficácia não estão completamente elucidados, trazendo a necessidade de mais estudos que possam esclarecer estas questões.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Observar os efeitos associados à infusão de células mononucleares de medula óssea, na histologia e na função hepática, em modelo de cirrose induzida em ratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficácia da injeção portal de células mononucleares de medula óssea no repovoamento hepático.
- Observar os efeitos da infusão de células mononucleares de medula óssea na função hepática através da quantificação de albumina e bilirrubinas séricas.
- Analisar marcadores de dano hepático através da quantificação sérica de aminotransferases e fosfatase alcalina e dano renal através da quantificação sérica da creatinina em ratos com cirrose induzida após a infusão de células mononucleares de medula óssea.
- Comparar o padrão histológico hepático dos ratos com cirrose induzida após a infusão de células mononucleares de medula óssea com um grupo controle.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Delineamento: estudo experimental

Fator de exposição: transplante de células mononucleares de medula óssea

Desfecho: avaliação da função hepática

Variáveis avaliadas: quantificação da fibrose no tecido hepático, identificação de células provenientes do doador no tecido hepático, dosagem de aminotransferases, fosfatase alcalina, albumina, bilirrubinas e creatinina séricas.

5.2 ÉTICA

Todos os procedimentos adotados durante as técnicas envolvendo os animais estão de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), cumprindo as prerrogativas da Constituição do Estado Lei nº 11.915, artigo 82, inciso IV, de 21 de maio de 2003.

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica da Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS.

5.3 ANIMAIS

O presente estudo foi realizado em ratos *Wistar* fêmeas, pesando entre 200 e 300 g, criados sob condições de biotério convencional, na Coordenação de Produção e Experimentação Animal (CPEA), do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT), da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) do Rio Grande do Sul e mantidos em estante isoladora no alojamento transitório para animais do Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica, prédio 64, da PUCRS.

Todos os animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (NUVITAL-NUVILAB CR-1®), em quantidade diária de 16g, receberam água *ad libitum* e mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com cama de maravalha de pinus selecionado,

devidamente identificadas, com fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (6h/18h). A dieta e hidratação foram revisadas diariamente e a troca das camas efetuada três vezes por semana.

5.4 ANESTESIA E ANALGESIA

Após pesados em balança analítica (Marte[®], AM220), os ratos foram anestesiados com solução de Ketamina 80% e Clorpromazina 20%, perfazendo uma dose de 0,3 mL/100g de peso de animal, por via intraperitoneal.

Considerando-se o consumo médio diário de 15 mL de água por dia por animal, administrou-se a analgesia por via oral. Foi utilizado como analgésico Paracetamol 200 mg/kg/dia, diluído na água ofertada ao rato, durante uma semana.

5.5 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada através de injeção intracardíaca de cloreto de potássio com anestesia geral prévia, método este preconizado pela Resolução 714, de 20 de junho de 2002, Artigo 15, Anexo I, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e outras providências, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (atualizado em 24 de junho de 2002) e pelo COBEA:

A carcaça dos animais foi depositada em saco branco leitoso, com espessura de 12 micras, especial para armazenamento dos animais em congelador, nas dependências do Laboratório de Microcirurgia, prédio 64, da PUCRS. As carcaças foram recolhidas pelo Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) através de um sistema de coleta especial.

5.6 DESENHO EXPERIMENTAL

Todos os animais tiveram cirrose induzida através de ligadura de ducto biliar comum.

No 14º dia após a realização da ligadura os ratos foram randomizados, através de sorteio, para receber infusão de células mononucleares de medula óssea na concentração de 1×10^7 células mononucleares (grupo tratado), provenientes de ratos machos, via veia porta, orientada

por ultrassonografia e um grupo controle que foi submetido ao mesmo estresse do procedimento, porém sem injeção celular.

No 28º dia todos os animais foram sacrificados através da realização de eutanásia, procedendo-se à coleta sanguínea para análise bioquímica e hepatectomia para análise histológica e imunohistoquímica.

Um diagrama esquemático das etapas descritas acima é apresentado na Figura 4.

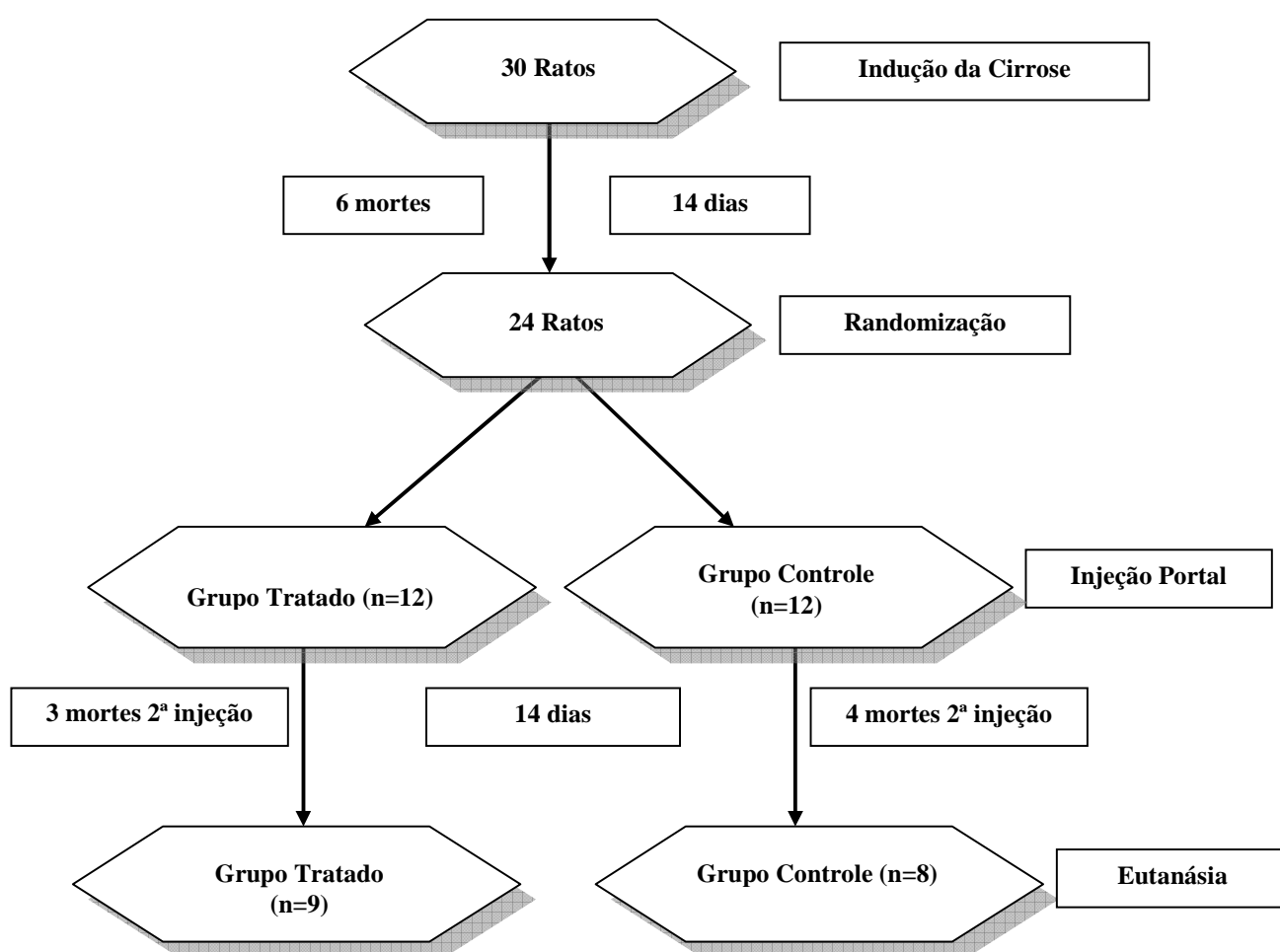


Figura 4 - Fluxograma do desenho experimental.

5.7 INDUÇÃO DE CIRROSE

A cirrose hepática foi induzida através da ligadura do ducto biliar, segundo modelo proposto por Kountouras e colaboradores, em 1984, no qual a ligadura do ducto biliar induz cirrose num período de 15 a 28 dias (80).

Após anestesia, procedeu-se à incisão da pele na linha mediana, desde o apêndice xifóide até a cicatriz umbilical. Foram expostos os órgãos (estômago, fígado e intestino delgado) e o ducto biliar comum com abaixamento do duodeno; seguiu-se a dupla ligadura do ducto biliar comum, colocadas o mais proximal e mais distal possível, seccionando-se posteriormente a porção do ducto biliar entre as ligaduras. A cavidade abdominal foi fechada com pontos simples, envolvendo o peritônio, o tecido muscular e o plano cutâneo (Figura 5).

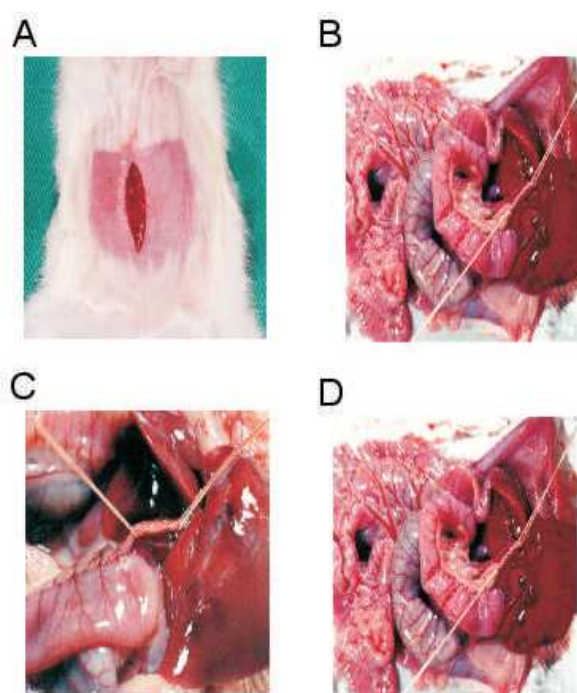


Figura 5 - Cirurgia para ligadura biliar.

Nota - (A) Incisão mediana. (B, C e D) Isolamento do ducto biliar principal para posterior secção.

5.8 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Para a obtenção das células de medula óssea, foram utilizados ratos *Wistar* machos, anestesiados com 0,4-0,6 mL de uma solução contendo Ketamina (0,8%) e Clorpromazina

(0,2%), conforme o peso do animal, e sacrificados com injeção intracardíaca de cloreto de potássio. A seguir, a tíbia, o fêmur e o úmero dos animais foram dissecados, realizando-se dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular, onde foram injetados 10 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL*) sem soro.

O material obtido foi ressuspenso e centrifugado a 1.500 rpm, durante 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspenso em DMEM sem soro, num volume de cerca de 4 mL e transferido para outro tubo de 15 mL, contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g/mL – Sigma Aldrich) (diluição Ficoll: meio de 1:1), evitando que as duas fases líquidas se misturassem. Centrifugou-se a 400 g por 30 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foi coletado o anel de células mononucleares na interface Ficoll-meio de cultura e as células foram lavadas com 15 mL de solução tampão fosfato/salina (PBS) por duas vezes. Centrifugou-se novamente a 1.500 rpm, durante 10 minutos à temperatura ambiente, desprezando o sobrenadante.

As células foram ressuspensas com 1 mL de PBS e foi realizada contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com azul de Tripán em câmara de Neubauer.

Após contagem a solução foi dividida em alíquotas de 1×10^7 células para realizar injeção portal.

5.9 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS POPULAÇÕES PRESENTES NA INFUSÃO USADA NO GRUPO TRATADO

As células provenientes da medula óssea (CMO) de ratos *Wistar* foram avaliadas por citometria de fluxo com os seguintes anticorpos: CD45, CD49b e CD90 (BD Pharmigen, San Diego, USA) na concentração de um 1:10 em PBS.

Após incubação a 5° C no escuro por 15 minutos, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 1 mL de paraformaldeído 4% (em PBS) para análise em citômetro de fluxo. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA). Os dados obtidos correspondem a, pelo menos, 50.000 eventos.

5.10 TÉCNICA PARA INJEÇÃO CELULAR

Após a contagem celular em câmara de Neubauer, cada fração de 1×10^7 células foi diluída em PBS, perfazendo volume total de 0,3 mL, acondicionados em seringas de 1,0 mL com agulha de 22 gauges.

Utilizando-se aparelho de ecografia marca Philips HD-11 XE, com transdutor vascular, na frequência de 5-12 MHz, foi realizado estudo dopplervelocimétrico, para localização do fluxo da veia porta em sua porção intra-hepática. Após a localização procedeu-se a infusão celular, através de injeção intravascular orientada.

5.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Após anestesia, antes da realização da eutanásia, foi coletado 1 mL de sangue, através da punção da veia cava inferior, para análise bioquímica.

No Laboratório de Biofísica da PUCRS, foram analisadas amostras de soro que previamente foram congeladas. Através do método de espectrofotometria foram analisadas alanino aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), albumina e creatinina.

5.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

O exame anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, por patologistas cegados quanto ao tratamento recebido pelos animais.

Através de dissecação anatômica, após eutanásia, retirou-se o fígado dos ratos, que foram incluídos em bloco de parafina.

Os blocos foram fixados em micrótomo onde se realizaram cortes de 3 micra. Nas fases de coloração as lâminas foram mergulhadas nos corantes hematoxilina-eosina durante 5 minutos cada, intermediadas por um banho de água corrente.

Foi realizada coloração de picrossirius segundo protocolo proposto por Junqueira *et. al.*, em 1979 (81) para avaliação da área de fibrose, utilizando-se a técnica de quantificação morfométrica da densidade de colágeno, empregada por Chevallier *et. al.* (82). A partir do material histológico corado com picrossirius, em dez imagens captadas em dispositivo físico, no formato *tag image format* (TIFF), realizado em um sistema de análise computadorizada de imagens, obteve-se a quantificação automática da área de fibrose presente em um campo de superfície. A análise de imagem foi feita com o *software Image-Pro Plus*, versão 4.1, da *Media Cybernetics*.

5.13 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise imunohistoquímica foi realizada utilizando-se o anticorpo policlonal de coelhos Anti-Sox 18 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), que reconhece o Sox 18, fator de transcrição do grupo de alta mobilidade (HMG), relacionado ao SRY (proteína da região determinante do sexo Y), que está envolvido na regulação do desenvolvimento do embrião e determinação da linhagem celular (83, 84). O objetivo da imunohistoquímica é verificar quais células no tecido hepático de ratos fêmeas são provenientes dos doadores machos.

5.14 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Para comparação de médias independentes, com nível de significância de 0,05, poder de 90%, razão de tamanho de amostra 1:1, estimou-se que são necessários 09 animais no grupo controle e no grupo submetido à terapia celular. Esta estimativa foi realizada utilizando-se o “Samples” do programa PEPI, versão 3.0 (JH Abranson, PM Gahlinger), 1993–9.

5.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram expressos em média \pm desvio padrão para variáveis com distribuição simétrica e em mediana (valor mínimo-valor máximo) para variáveis com distribuição assimétrica. Para comparação dos grupos foram utilizados os testes *t* de Student e

Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi $\alpha= 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o programa SPSS, versão 13.0.

6 RESULTADOS

6.1 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos *Wistar*, com idade média de 58,8 dias e peso médio de 235 gramas, cuja sequência se encontra descrita também na seção 5.6:

Primeira etapa: os ratos foram submetidos à ligadura biliar para indução da cirrose. Nesta etapa ocorreram seis mortes, em um período de 07 dias após a realização da cirurgia, atribuídas ao procedimento.

Segunda etapa: 14 dias após a realização do procedimento os ratos foram randomizados para grupo controle e grupo tratamento.

Terceira etapa: 12 ratos em cada grupo realizaram a injeção portal de células mononucleares da medula óssea ou injeção salina. Ocorreram sete mortes nas primeiras 24 horas após a injeção, sendo três no grupo da terapia celular e quatro no grupo controle, relacionadas diretamente ao procedimento.

Quarta etapa: restaram oito ratos no grupo controle e nove ratos no grupo tratamento que foram submetidos à eutanásia 14 dias após a injeção portal para análise final.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CELULAR TRANSPLANTADA

A caracterização fenotípica das células mononucleares da medula óssea utilizadas no grupo tratado foi determinada por citometria de fluxo e demonstrou que 28,75% das células apresentavam marcador CD45. O CD49b estava presente em 1,65% das células e o CD90 estava presente em 31,15% das células transplantadas. A Figura 6 apresenta o histograma dos dados descritos.

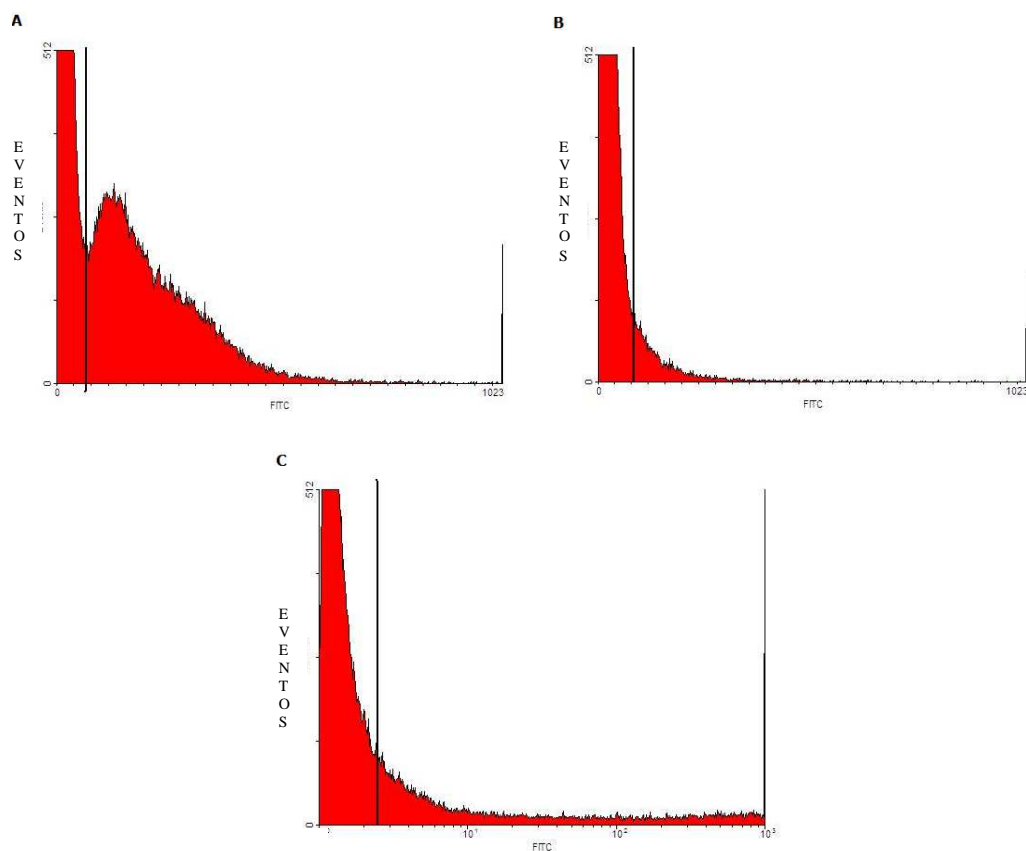


Figura 6 - Histograma mostrando o número de eventos e a intensidade de fluorescência (FITC) para (A) CD45, (B) CD49b, (C) CD90.

6.3 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE CÉLULAS PROVENIENTES DO ANIMAL DOADOR NO TECIDO HEPÁTICO

Os fígados de ratos que receberam transplante celular foram submetidos à imunohistoquímica com anticorpo anti-Sox 18, para verificar a incorporação de células provenientes do doador macho.

A análise do tecido hepático demonstrou que a injeção de células mononucleares de medula óssea na veia porta apresenta uma eficácia de 75% para incorporação das células do doador no órgão receptor. Dos nove ratos que receberam a infusão celular via veia porta, sete apresentaram forte marcação do anti-Sox 18 (Figura 7) principalmente em região periportal, enquanto dois não apresentaram marcação.

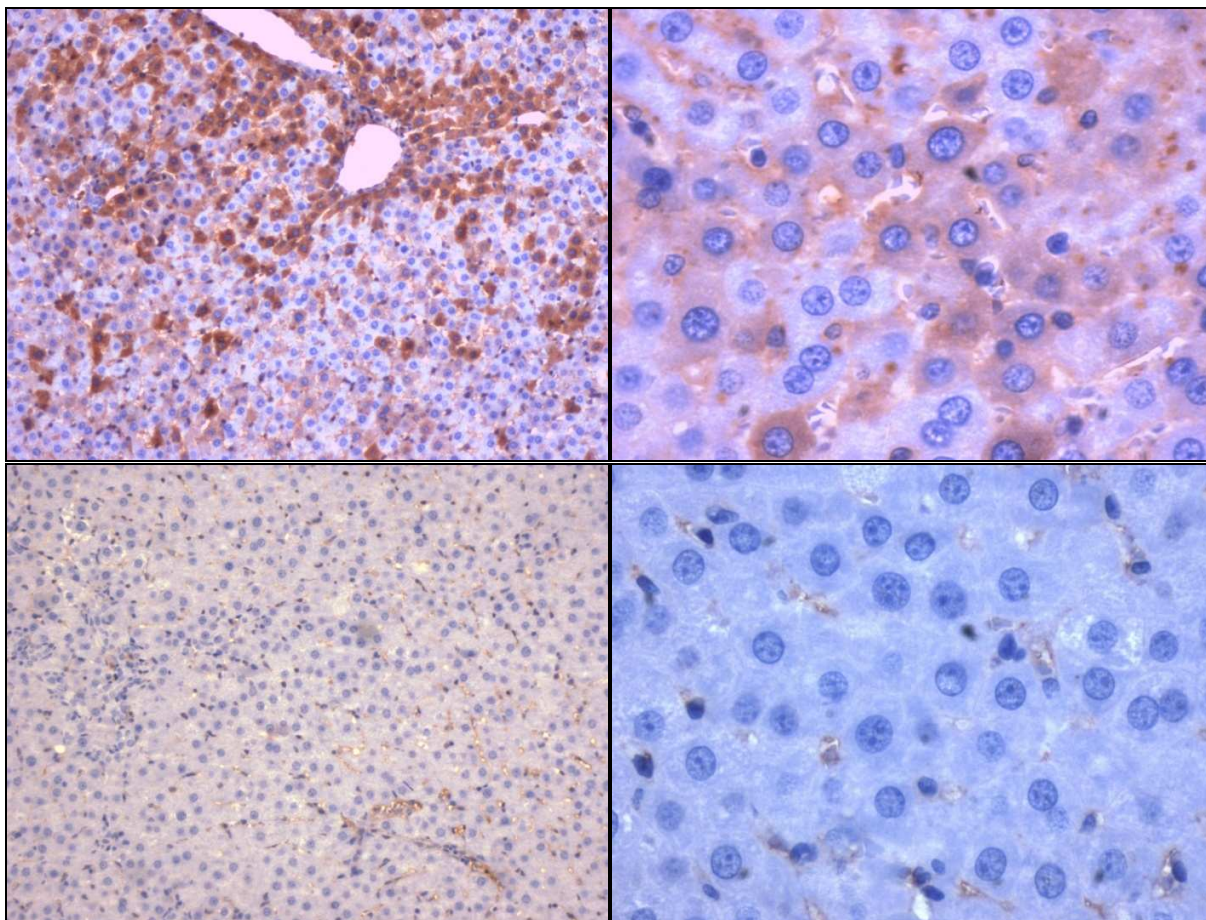


Figura 7 - Fotomicrografia de fígado de ratos mostrando a marcação para Sox-18 pela técnica de imunohistoquímica.

Nota - A e B representam fígados de ratos que receberam transplante de células mononucleares de medula óssea com aumento de 10x e 40x, respectivamente. C e D representam fígados de ratos do grupo controle com aumento de 10x e 40x, respectivamente.

6.4 COMPARAÇÃO DA FIBROSE HEPÁTICA APÓS TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

A análise quantitativa da fibrose hepática, realizada através da coloração de picrossirius, evidenciou um menor percentual significativo de fibrose, 1,05% (0,46 a 2,82), no grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, 2,06% (0,72 a 4,77), com $P=0,036$.

Tabela 1 - Percentual de fibrose em ratos Wistar com cirrose induzida submetidos ao tratamento com células mononucleares de medula óssea e animais controle, determinado pela técnica de picrossirius.

Variável	<u>Grupo Tratado</u> n=9	<u>Grupo Controle</u> n=8	<i>P</i>
Fibrose,%	1,05 (0,46 a 2,82)	2,06 (0,72 a 4,77)	0,036 [†]

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo). † Teste de Mann-Whitney.

6.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS

A Tabela 2 apresenta os resultados quantitativos da análise bioquímica da albumina, alanino aminotransferase, aspartato aminotransferase, bilirrubina total, fosfatase alcalina e creatinina obtida nos animais que receberam tratamento com células mononucleares de medula óssea e grupo controle. Não houve diferença estatística em todos os parâmetros avaliados, notando-se uma tendência à piora dos níveis de creatinina no grupo que recebeu células.

Tabela 2 - Resultado das análises quantitativas dos parâmetros bioquímicos em ratos Wistar com cirrose induzida submetidos ao tratamento com células mononucleares de medula óssea e animais controle.

Variável	<u>Grupo-Tratado</u> n=9	<u>Grupo Controle</u> n=8	<i>P</i>
Albumina, g/dL	2,48±0,42	2,23±0,36	0,231*
BT, mg/dL	4,01±0,86	3,91±0,41	0,785*
ALT, UI/mL	23,7 (10 a 61)	13,45 (8 a 39)	0,277 [†]
AST, UI/mL	81,5 (29,4 a 183,7)	67,1 (45,1 a 110,1)	0,423 [†]
FA, UI/l	41,3 (27,3 a 87,2)	33,8 (25,3 a 94,8)	0,673 [†]
Cr, mg/dL	1,08±0,31	0,82±0,20	0,065*

Os dados são apresentados como mediana (mínimo ao máximo) ou média ± desvio padrão. BT= bilirrubina total; AST= aspartato aminotransferase; ALT= alanino aminotransferase; FA= fosfatase alcalina; Cr= creatinina.* Teste *t* de Student. † Teste de Mann-Whitney.

6.6 COMPARAÇÃO DO EFEITO DA PRESENÇA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NOS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Quando se analisou a repopulação do tecido hepático por células mononucleares da medula óssea dos animais (n=7), evidenciada pela marcação positiva para o anticorpo Sox-18, comparado com os fígados que não apresentaram marcação para este anticorpo (n=10), verificou-se que além da redução da fibrose hepática, 0,99% (0,46 a 2,82) versus 1,88 % (0,72 a 4,77), com $P= 0,043$, houve também melhora dos níveis de albumina, $2,66 \pm 0,27$ g/dL versus $2,16 \pm 0,36$ g/dL, com $P= 0,008$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação por incorporação celular das variáveis histológicas e bioquímicas em ratos Wistar com cirrose induzida.

Variável	<u>Células Sox-18⁺</u> n=7	<u>Células Sox-18⁻</u> n=10	P
Fibrose, %	0,99 (0,46 a 2,82)	1,88 (0,72 a 4,77)	0,043†
Albumina, g/dL	2,66±0,27	2,16±0,36	0,008*
BT, mg/dL	4,2±0,87	3,78±0,45	0,205*
ALT, UI/mL	23,7 (10 a 61)	13,45 (8 a 39)	0,315†
AST, UI/mL	81,5 (29,4 a 183,7)	71,3 (45,1 a 150,3)	0,887†
FA, UI/l	33,9 (27,3 a 87,2)	55,3 (25,3 a 94,8)	0,740†
Cr, mg/dL	1,09±0,33	0,87±0,23	0,134*

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo) ou média \pm desvio padrão. BT= bilirrubina total, AST= aspartato aminotransferase, ALT= alanino aminotransferase, FA= fosfatase alcalina e Cr= creatinina. * Teste *t* de Student. † Teste de Mann-Whitney.

7 DISCUSSÃO

A cirrose, por sua prevalência e mortalidade, tornou-se um dos principais problemas de saúde do mundo. A inexistência de tratamentos efetivos, já que o transplante hepático, o único tratamento curativo disponível, apresenta limitações relacionadas à disponibilidade de órgãos, imunossupressão e prolongadas listas de espera, traz a necessidade de novas alternativas.

As células de medula óssea têm sido estudadas extensivamente nos últimos anos como alternativa para várias doenças, incluindo aquelas que afetam o fígado. A importância de estudar a terapia com células de medula óssea é inquestionável na perspectiva de desenvolver um tratamento que possa melhorar a evolução da cirrose em humanos, prolongando a sobrevida em lista para transplante ou até revertendo o quadro de disfunção hepatocelular e insuficiência hepática.

O modelo experimental escolhido, ligadura de ducto biliar, representa um método rápido, consistente e irreversível de indução de fibrose e cirrose hepática. O dano hepatocelular é causado por colestase, levando à inflamação periportal e promoção da fibrogênese com consequente disfunção hepática, insuficiência hepática e morte. Apresenta como limitações a rápida morte causada pela ligadura, impossibilitando o seguimento a longo prazo dos resultados obtidos com a terapêutica, e a incapacidade de reproduzir de maneira fidedigna os mecanismos fibrogênicos humanos (85), característica de todos os modelos experimentais animais.

O outro modelo que é amplamente utilizado, a administração de tetracloreto de carbono (CCl_4), foi descartado neste estudo por ser substância de comercialização e produção proibida no país desde 1996, apresentando índices de mortalidade que variam entre 40% a 100% em ratos, contando ainda com altas taxas de variabilidade na eficácia da indução da cirrose e existir a possibilidade de reversão espontânea do dano hepático após a interrupção da administração da droga (86).

A alta mortalidade encontrada neste estudo pode ser decorrente de dois fatores distintos. O primeiro se deve ao trauma cirúrgico para realização da ligadura com consequente morte dos ratos, principalmente nas cirurgias iniciais, fator que não influencia nos resultados finais, já que somente os ratos que tiveram indução de lesão hepática com sucesso foram submetidos ao tratamento. O segundo fator é atribuído à injeção portal. Dos 24 ratos que foram submetidos à

punção da veia porta, sete morreram nas primeiras 24 horas após o procedimento, fator relevante, se a técnica utilizada em humanos fosse semelhante.

Em ratos é impossível a cateterização de veia porta ou de artéria hepática por outra via que não seja punção direta tanto pela falta de materiais adequados quanto pelo diâmetro da veia porta do animal. Em humanos, entretanto, já se encontra amplamente desenvolvida a técnica de arteriografia hepática, com acesso radial ou femoral, realizada principalmente para terapias locais como a quimioembolização de carcinomas hepatocelulares, apresentando mínimas complicações como hematomas e dor no local da punção (87-90), representando esta uma via segura para uma possível terapia celular em humanos.

Um dos pontos relevantes do estudo é a avaliação da eficácia do tratamento com injeção local das células mononucleares de medula óssea através da veia porta e não uma via sistêmica para administração como a injeção em veia caudal dos ratos, via utilizada na maior parte dos experimentos. Apenas Zeng e Liang (91) e Carvalho *et al.* (92) avaliaram a veia porta como via para a terapia celular em modelos animais de hepatopatia anteriormente. Evidências observadas em ensaios clínicos realizados em doenças cardiovasculares e neurológicas, mostraram que a injeção local de células mononucleares de medula óssea se mostra eficaz na obtenção dos efeitos terapêuticos desejados, levando o grupo a escolher a injeção na veia porta como a ideal para o presente estudo (54, 56, 64, 93, 94).

A fração mononuclear da medula óssea apresenta três tipos de células pluripotentes: as células-tronco hematopoiéticas, as células-tronco mesenquimais e células periféricas (*side population cells*). A citometria de fluxo demonstrou que 31,5% das células transplantadas apresentavam marcadores de células-tronco hematopoiéticas, o CD90, enquanto apenas 1,65% das células apresentavam marcadores de células epiteliais, plaquetas e linfócitos, o CD49b, indicando que a população celular injetada estava adequada aos objetivos do estudo.

Evidências cumulativas indicam que as células mononucleares da medula óssea podem diferenciar-se em diversos tipos de células tecido-específicas e que, quando transplantadas em determinadas condições, repovoam tecidos como células hepáticas (95). A análise imunohistoquímica do tecido hepático no presente estudo evidenciou uma grande concentração de células derivadas da medula óssea do doador em 75% dos ratos submetidos à terapia celular, além de uma maior densidade na área periportal que é o local de maior injúria tecidual no modelo de ligadura de ducto biliar.

Sabe-se, por estudos de Sato e cols. (48) e Aurich e cols. (96), que após uma injeção simples celular, apenas 1% a 3% do fígado normal é repopulado pelas células do doador e, também, que esta população celular tende a decair com o tempo (97). A observação de uma grande população de células com morfologia de hepatócitos provenientes do doador, portanto, reforça a idéia de que a injeção local é a via ideal para a terapia celular, mesmo sabendo-se da presença de fatores quimiotáticos, que possam contribuir para o sucesso do tratamento, quando usado sistemicamente (98). O fato de não terem sido observados repopulação em dois animais vem de encontro com estudos como de Nakamura e cols. (99) e Quintanilha e cols. (100), que têm demonstrado uma maior eficácia na repopulação após injeções celulares sucessivas.

O mecanismo pelo qual as células de medula óssea regeneram o tecido hepático lesado ainda não está completamente esclarecido. Existem evidências demonstrando que a fusão celular ou a transdiferenciação possam explicar tais achados (40, 101, 102), porém o mais provável é que ambos os mecanismos ocorram simultaneamente. A análise deste mecanismo poderia ser realizada através do uso de vetores virais associados às células transplantadas ou estudo citogenético (101).

Questiona-se também qual população celular da medula óssea é responsável pelo efeito terapêutico observado. Yamamoto e cols. (103) usando anticorpos anti-Liv8, marcador de células-tronco hematopoiéticas, mostraram que as células-tronco Liv8 negativas (células-tronco mesenquimais) melhoram a função hepática e reduzem a fibrose em maior proporção que as células Liv8 positivas, sugerindo que as células-tronco mesenquimais têm maior participação no processo de repopulação e melhora da função sintética. Entretanto outros trabalhos bem conduzidos, como de Carvalho e cols. (92), não demonstraram eficácia do transplante isolado de células-tronco mesenquimais em modelos de hepatopatia crônica, sugerindo, que, além do efeito celular, outras variáveis, como fatores de crescimento em geral, possam contribuir para o sucesso do transplante de células de medula óssea (104). Por estes motivos acreditamos que a infusão da fração mononuclear de células de medula óssea seja a terapêutica mais eficaz para hepatopatias crônicas, pois nela encontramos também a presença de células produtoras de fatores de crescimento.

Os resultados da terapia celular em modelos de hepatopatia crônica, sobre a fibrose e função hepática são conflitantes. Enquanto, a maior parte dos estudos vem mostrando efeitos terapêuticos benéficos sobre a função e fibrose hepática (72, 91, 97-99, 105-107), existem relatos

de ineficácia desta terapêutica (92, 100, 108) e ainda de piora da fibrose com o transplante de células mononucleares de medula óssea (109, 110).

Em um ambiente pró-fibrótico causado pela ligadura biliar, com liberação de mediadores parácrinos como o TGF- β , o fator de crescimento do tecido conjuntivo, o fator de crescimento derivado das plaquetas e a endotelina-1, há quimiotaxia e ativação das células estreladas e fibroblastos portais (111, 112). Sabe-se, também, que um pequeno número de fibroblastos intersticiais, o principal responsável pela fibrose orgânica, são derivados de células de medula óssea em vários órgãos, incluindo o rim e o intestino (113, 114). Foi demonstrado por Forbes e cols. (115) e por Asawa e cols. (110) que as células da medula óssea diferenciam-se em miofibroblastos e fibroblastos, contribuindo para a fibrose hepática, na lesão biliar. Deste modo seria esperado que o transplante de células de medula óssea contribuísse para a piora da fibrose e, conseqüentemente, da função hepática.

Esse estudo demonstrou, ao contrário, uma diminuição significativa da fibrose no grupo submetido à terapia celular, quando comparado ao grupo controle. Além disso, nos ratos que apresentaram repopulação hepática por células provenientes do doador, verificou-se um aumento nos níveis séricos de albumina, o que poderia traduzir uma melhora da função sintética hepática. Nossas observações vão de encontro com as descritas por Abdel Aziz e cols. (98), Oyagi e cols. (106), Highashima e cols. (97) e Zheng e cols. (91). O mecanismo do efeito benéfico das células mononucleares de medula óssea sob a lesão hepática crônica ainda não está completamente esclarecido, levando a várias hipóteses a respeito.

Ishikawa e cols. demonstraram que as células mononucleares de medula óssea diminuem a fibrose hepática através do aumento da secreção de metaloproteinases de matriz (MMP) como a MMP-2, MMP-9 e MMP-13, fatores que participam da degradação da matriz extracelular, além de acelerar a proliferação das células derivadas da medula óssea e de diminuir a apoptose (104). Moriya e cols. evidenciaram que além da MMP-9 ser secretada pelas células derivadas da medula óssea, ocorre um aumento de sua secreção por células do próprio receptor, através de um efeito parácrino (116).

As células-tronco mesenquimais poderiam também secretar uma variedade de citocinas angiogênicas como o fator de crescimento endotelial vascular e contribuir para redução da fibrose através da facilitação da ação de mecanismos parácrinos, como demonstrado por Kinnaird e cols.

(117) e Silva e cols. (118). As citocinas arteriogênicas teriam ainda capacidade de restauração dos sinusóides hepáticos (119).

In vitro, Zhao e cols. (105) evidenciaram que a co-cultura de células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas, poderiam aumentar o número de células estreladas na fase G₀ e reduzir o número de células em fase S, inibindo a transição destas células do estado quiescente para o estado ativado. Além disso, as células-tronco poderiam aumentar a apoptose das células estreladas já ativadas, através da supressão do TGF- β no tecido hepático (99).

Outro fator que pode contribuir para a melhora da função hepática e a diminuição da fibrose é o relato de que os hepatócitos derivados da medula óssea apresentam uma forte vantagem de sobrevivência sobre os hepatócitos residentes, permitindo que eles repopulem progressivamente o fígado lesado, produzindo albumina de maneira eficaz (71, 76).

Após a infusão de células-tronco verifica-se o aumento da expressão de vários fatores de regeneração hepática, incluindo fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fazendo com que ocorra uma alta proliferação de hepatócitos e consequente aumento do poder de síntese do fígado (99).

Diante das evidências reportadas, acredita-se que os achados do presente estudo não se justificam somente pela reposição das células danificadas no fígado, mas também pelas mudanças causadas no microambiente hepático pelas células mononucleares de medula óssea, promovendo regeneração hepática, provavelmente através de vários fatores secretados, que estimulam a fibrólise e a neovascularização, com consequente melhora da função hepática.

O estudo apresenta limitações como o pequeno número de animais analisados, a alta mortalidade obtida através da técnica de injeção portal e o curto período de seguimento após o transplante celular, entretanto estas limitações não invalidam os achados do estudo. É evidente a necessidade de mais estudos que elucidem os mecanismos de ação das células de medula óssea, que determinem a via ideal para o transplante celular, a densidade celular necessária para a infusão e o paciente ideal para ser submetido à terapêutica, para, talvez, em um futuro próximo pacientes em lista de espera possam ter seu transplante hepático, pelo menos, retardado pela terapia com células de medula óssea.

8 CONCLUSÕES

As observações do estudo da infusão intraportal de células mononucleares de medula óssea em modelo de cirrose induzida em ratos permitem concluir que:

- A injeção portal de células mononucleares de medula óssea mostrou-se eficaz na repopulação do tecido hepático do receptor.
- A infusão de células mononucleares de medula óssea aumentou de maneira estatisticamente significativa os níveis séricos de albumina quando houve repopulação hepática, não se observando alteração nos níveis séricos de bilirrubina.
- Não se observaram alterações nos marcadores de dano hepático, representados pelas aminotransferases e fosfatase alcalina e dano renal, representado pela creatinina, após a injeção celular.
- Houve redução estatisticamente significativa da fibrose hepática após a infusão celular comparando-se ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

1. Torok NJ. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2008;43:315-321.
2. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
3. La Vecchia C, Levi F, Lucchini F, Franceschi S, Negri E. Worldwide patterns and trends in mortality from liver cirrhosis, 1955 to 1990. *Ann Epidemiol* 1994;4:480-486.
4. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
5. Roguin A. Rene Theophile Hyacinthe Laennec (1781-1826): the man behind the stethoscope. *Clin Med Res* 2006;4:230-235.
6. Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 2004;40:860-867.
7. Hsiang-Ching Kung PDDLH, Ph.D.; Jiaquan Xu, M.D.; , Sherry L. Murphy BS. Deaths: Final Data for 2005. *National Vital Statistics Reports* 2008;56:1-121.
8. WHO. Mortality Database. 2006 [cited; Available from: <http://www.who.int/healthinfo/morttables/en/inex.htm>].
9. Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA, Negri E, La Vecchia C. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 2007;46:827-839.
10. Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1728-1734.
11. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655-1669.
12. Li JT, Liao ZX, Ping J, Xu D, Wang H. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. *J Gastroenterol* 2008;43:419-428.
13. Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004;1:98-105.
14. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matriz as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372.
15. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Arenson DM, Bissell DM. Maintenance of differentiated phenotype of cultured rat hepatic lipocytes by basement membrane matriz. *J Biol Chem* 1989;264:10756-10762.

16. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384.
17. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol* 2005;42 Suppl:S100-107.
18. Cholongitas E, Papatheodoridis GV, Vangeli M, Terreni N, Patch D, Burroughs AK. Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:1079-1089.
19. de Franchis R. Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension. *J Hepatol* 2005;43:167-176.
20. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl* 2004;10:886-897.
21. Registro Brasileiro de Transplante; 2008 Janeiro/Junho. Report No.: Ano XIV- Nº1.
22. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-582.
23. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.
24. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 2006;7:319-327.
25. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
26. Palacios R, Golunski E, Samaridis J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7530-7534.
27. Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999;285:754-756.
28. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394.
29. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98:216-224.

30. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56.
31. Mizumoto H, Aoki K, Nakazawa K, Ijima H, Funatsu K, Kajiwara T. Hepatic differentiation of embryonic stem cells in HF/organoid culture. *Transplant Proc* 2008;40:611-613.
32. Matsumoto K, Mizumoto H, Nakazawa K, Ijima H, Funatsu K, Kajiwara T. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in a bioreactor using polyurethane/spheroid culture. *Transplant Proc* 2008;40:614-616.
33. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000;287:1431-1433.
34. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-155.
35. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-1710.
36. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002;100:4266-4271.
37. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
38. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
39. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-1782.
40. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904.
41. Bianco P, Reginacci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192.
42. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
43. Yin L, Lynch D, Sell S. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *J Hepatol* 1999;31:497-507.

44. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
45. Galmiche MC, Koteliansky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82:66-76.
46. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-1284.
47. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10711-10716.
48. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.
49. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-648.
50. Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminiere C, Xue R, Delmas Y, Combe C, et al. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology* 2006;238:200-210.
51. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
52. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-1084.
53. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001;126:932-938.
54. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1690-1699.
55. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-148.
56. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-95.

57. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-121.
58. Martino HF, Oliveira PS, Assuncao E, Villela R, Gaze M, Costa PC, Souza FC, et al. [Cell therapy in dilated cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:390-392.
59. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002;1:92-100.
60. Savitz SI, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR. Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol* 2002;52:266-275.
61. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000;55:565-569.
62. Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, et al. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 2005;103:38-45.
63. Stillely CS, Ryan CM, Kondziolka D, Bender A, DeCesare S, Wechsler L. Changes in cognitive function after neuronal cell transplantation for basal ganglia stroke. *Neurology* 2004;63:1320-1322.
64. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57:874-882.
65. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005;11:551-555.
66. Kirik D, Bjorklund A. Histological analysis of fetal dopamine cell suspension grafts in two patients with Parkinson's disease gives promising results. *Brain* 2005;128:1478-1479.
67. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710-719.
68. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53.
69. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, Carrasco D, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000;32:852-858.

70. Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164.
71. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
72. Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005;38:197-202.
73. Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, et al. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng* 2005;100:77-81.
74. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CCl4 model--translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;12:203-207.
75. Sakaida I, Terai S, Okita K. Use of bone marrow cells for the development of cellular therapy in liver diseases. *Hepatol Res* 2005;31:195-196.
76. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304-1311.
77. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1067-1073.
78. Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishnan HR, Venkateswarlu J, Rao SG, et al. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 2008;40:1140-1144.
79. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
80. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-311.
81. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-455.

82. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-355.
83. Stanojic S, Stevanovic M. The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:237-241.
84. Pennisi DJ, James KM, Hosking B, Muscat GE, Koopman P. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome* 2000;11:1147-1149.
85. Chang ML, Yeh CT, Chang PY, Chen JC. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol* 2005;11:4167-4172.
86. Beddowes EJ, Faux SP, Chipman JK. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 2003;187:101-115.
87. Shiozawa S, Tsuchiya A, Endo S, Kato H, Katsube T, Kumazawa K, Naritaka Y, et al. Transradial approach for transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with conventional transfemoral approach. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:412-417.
88. Sumie S, Yamashita F, Ando E, Tanaka M, Yano Y, Fukumori K, Sata M. Interventional radiology for advanced hepatocellular carcinoma: comparison of hepatic artery infusion chemotherapy and transcatheter arterial lipiodol chemoembolization. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:1327-1334.
89. Watanabe S, Minami A, Nishioka M, Ohkawa M, Kouji F. Left brachial approach for transcatheter arterial embolization therapy in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1997;42:47-58.
90. Kiely JM, Rilling WS, Touzios JG, Hieb RA, Franco J, Saeian K, Quebbeman EJ, et al. Chemoembolization in patients at high risk: results and complications. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17:47-53.
91. Zheng JF, Liang LJ. Intra-portal transplantation of bone marrow stromal cells ameliorates liver fibrosis in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7:264-270.
92. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, Paredes BD, Mannheimer EG, Carvalho FG, Asensi KD, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* 2008;26:1307-1314.
93. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;360:427-435.

94. de Freitas GR F-d-MM, Bezerra DC, Silva AS, Falcão CH, Gonzales CS, Moreira RC, Haddad AF, Tuche FA, Mesquita CT, Oliveira AA, Araujo MD, Garicochea B, Machado DC, Raupp EF, Andre C, Dohmann HJ, Friederich M. . Safety and feasibility of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in acute ischemic stroke. In: Annual Meeting of the American Academy of Neurology; 2006 April, 2006; San Diego, CA: ; 2006.
95. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
96. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
97. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007;45:213-222.
98. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:893-899.
99. Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, et al. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 2007;133:91-107 e101.
100. Quintanilha LF, Mannheimer EG, Carvalho AB, Paredes BD, Dias JV, Almeida AS, Gutfilen B, et al. Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2008;17:943-953.
101. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901.
102. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843-850.
103. Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, et al. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:1110-1118.
104. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Murata T, Mizunaga Y, et al. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res* 2007;327:463-470.

105. Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:3431-3440.
106. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006;44:742-748.
107. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox IJ. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000;31:851-857.
108. Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, et al. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002;35:799-804.
109. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006;130:1807-1821.
110. Asawa S, Saito T, Satoh A, Ohtake K, Tsuchiya T, Okada H, Neilson EG, et al. Participation of bone marrow cells in biliary fibrosis after bile duct ligation. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:2001-2008.
111. Abdel-Aziz G, Rescan PY, Clement B, Lebeau G, Rissel M, Grimaud JA, Champion JP, et al. Cellular sources of matrix proteins in experimentally induced cholestatic rat liver. *J Pathol* 1991;164:167-174.
112. Desmouliere A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 1997;76:765-778.
113. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
114. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341-350.
115. Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004;126:955-963.
116. Moriya K, Yoshikawa M, Ouji Y, Saito K, Nishiofuku M, Matsuda R, Ishizaka S, et al. Embryonic stem cells reduce liver fibrosis in CCl₄-treated mice. *Int J Exp Pathol* 2008;89:401-409.

117. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543-1549.
118. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111:150-156.
119. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura H, Hanada S, Hisamoto T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006;130:521-531.

ANEXOS

ANEXO 1. Folha de aprovação na Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

645/06-PG

Porto Alegre, 13 de setembro de 2006.

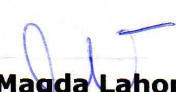
Ao Pós-Graduando
Lucas Spadari Maggioni
N/Faculdade

Prezado Pós-Graduando:

Informamos que a proposta de dissertação intitulada "Emprego de células tronco de medula óssea em modelo experimental de hepatopatia crônica terminal" **foi aprovada** pela comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Informamos que a mesma deve ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa através do CIDAPE, 2º andar do HSL. Em anexo, copia da avaliação.

Atenciosamente .


Prof. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Denise Cantarelli Machado

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/medicina

ANEXO 2. Folha de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0257/07-CEP

Porto Alegre, 19 de março de 2007.

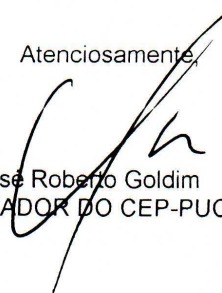
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, apreciou seu protocolo de pesquisa registro CEP 07/03598, intitulado: "**Emprego de células tronco de medula óssea em modelo experimental de hepatopatia crônica terminal**".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Profa Dra Denise Cantarelli Machado
N/Universidade


PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO 3. Submissão ao periódico Hepatology.

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 1

 Hepatology Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#) **SCHOLARONE™**
Manuscripts

You are logged in as Lucas Maggioni

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Hepatology*.

Manuscript ID: HEP-09-0786

Title: Intraportal Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Reduces Hepatic Fibrosis in Rats.

Maggioni, Lucas
Machado, Denise
Kupski, Carlos
Viezzler, Christian
Authors: Bettio, Jurandi
de oliveira, Jarbas
Lopes, Tiago
da Silva, Jeferson
da Costa, Jaderson

Date Submitted: 08-May-2009

[Print](#) [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.1.3 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO 4. Artigo submetido

TITLE PAGE

Title

Intraportal Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Reduces Hepatic Fibrosis in Rats.

Author Names

^{1,2}Lucas Spadari Maggioni (lucasmaggioni@hotmail.com)

^{1,2,3}Denise Cantarelli Machado (dcm@pucrs.br)

^{1,3}Carlos Kupski (ckupski@pucrs.br)

²Christian Viezzer (chviezzer@pucrs.br)

⁴Jarbas Rodrigues de Oliveira (jarbas@pucrs.br)

⁵Tiago Giuliani Lopes (tgiuliani@yahoo.com.br)

^{1,2}Jurandi Antonio Bettio (jurandi@clinoston.com.br)

^{1,6}Jeferson Braga da Silva (jeffmao@pucrs.br)

^{1,2,3}Jaderson Costa da Costa (jcc@pucrs.br)

Institutional affiliation: ¹Faculty of Medicine; ²Biomedical Research Institute; ³Internal Medicine Department; ⁴Biophysics Department; ⁵Pathology Department; ⁶Surgery Department. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 6690, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Keywords

Hepatocyte; cell therapy; liver cirrhosis; stem cell; bile duct ligation.

FOOTNOTE PAGE**Contact Information**

Lucas Spadari Maggioni

Av. Ipiranga, 6690, conj. 302, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

55-51333205002

lucasmaggioni@hotmail.com

List of abbreviations

PBS, phosphate-buffered saline; BMC, bone marrow cells; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; TB, total bilirubin

Financial Support

CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development/Brazil)

ABSTRACT

Recent reports have demonstrated the capacity of bone marrow cells to differentiate into hepatocytes and to contribute to the reduction of fibrosis and improvement of hepatic function. However, there are few studies on local infusion instead of systemic access for cell transplantation. The objective of this study was to evaluate the efficacy of portal injection of bone marrow cells in a model of chronic liver disease in rats. Twenty-four female Wistar rats, 14 days after ligation of the common bile duct were randomized to perform a transplantation of 1×10^7 mononuclear cells from bone marrow obtained from male Wistar rats or saline infusion by the portal route, guided by ultrasonography. On the 28th day of the experiment, the rats were sacrificed and serum albumin, bilirubin and aminotransferases were quantified. The area of hepatic fibrosis was determined by picosirius red staining and the identification of cells derived from male bone marrow was performed by immunohistochemical staining with anti-Sox 18 antibody. After transplantation, a strong hepatic repopulation with cells from the donor bone marrow was detected in 75% of the treated rats. There was a significant reduction in the area of fibrosis in the cell therapy group ($P=0.036$), without alteration in the biochemical parameters. However, when evaluating the group showing incorporation of bone marrow cells, besides a reduction in fibrosis ($P=0.043$), there was an increase in serum albumin levels ($P=0.008$). **In conclusion**, intraportal infusion of bone marrow cells is an efficacious method for hepatic repopulation, reduction of fibrosis and increase in serum albumin levels, making it a possible useful treatment of human cirrhosis.

Cirrhosis is a diffuse process of the liver characterized by fibrosis and conversion of the normal architecture into structurally abnormal nodules, associated with hemodynamic alterations in portal circulation with portal hypertension and hepatic dysfunction (1). It is estimated that 0.15% of the U.S. population has cirrhosis (2) and according to the World Health Organization, cirrhosis accounts for 800,000 deaths annually worldwide (3).

The transition of the compensated stage of cirrhosis to decompensated cirrhosis occurs at an annual rate of 5 to 7%, with a survival of 2 years after the first decompensation, requiring the application of effective treatments (4).

The only curative treatment available to date is liver transplantation. Five-year survival rates of 70% would make transplantation an ideal solution, but the increase in patient number on waiting lists, the scarcity of donors and mortalities of about 50% when listed, points to the need of an alternative therapy (5). This led to an interest to study the usefulness of stem cells for this purpose.

The literature suggests that transplanted bone marrow cells can serve as a source of hepatic progenitors and thereby contribute to the reduction of fibrosis and to improve of hepatic function (6-9). However, these studies evaluated transplantation through the systemic route, cell infusion via the caudal vein of rodents. Clinical studies of vascular diseases have demonstrated that the local injection of bone marrow cells represents an effective alternative for cell therapy, but its use in chronic liver disease has not yet been established.

The aim of this study was to evaluate the transplantation of bone marrow cells through the portal route and to determine their capacity to migrate into the liver, differentiate into hepatocytes and contribute to the improvement of hepatic function and reduction of liver fibrosis.

Materials and Methods

Animals. Female Wistar rats weighted between 200 and 300 g. All the procedures adopted were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHHS Publication N^o [NIH] 85-23, revised 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD) as attested by an institutional review board.

Experimental Protocol. The animals had induced cirrhosis by ligation of the bile duct, based on the model proposed by Kountouras (10). On the 14th day after this surgical procedure, 24 rats were randomly selected to receive bone marrow cells infusion at a dose of 1×10^7 mononuclear cells, from male rats, through the portal vein, guided by ultrasonography. One control group was submitted to the same stress of the procedure but received only saline injection. On the 28th day, all animals were euthanized, and blood was collected for biochemical analysis and hepatectomy was performed for histological analysis.

Preparation of Bone Marrow Mononuclear Cells. Bone marrow cells were obtained from male *Wistar* rats. They were fractionated on a Ficoll-Paque gradient and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) at a density of 1×10^7 cells/mL. Cells were counted and evaluated for viability by trypan blue exclusion in a Neubauer chamber. The bone marrow cells (BMC) from Wistar rats were evaluated by flow cytometry with the following antibodies: CD45, CD49b and CD90, at dilutions of 1:10 in PBS.

Technique for Cell Injection. Utilizing an apparatus for ultrasonography, Philips HD11 XE (Philips/Eindhoven/Holland), with a vascular transducer, at a frequency of 5-12

MHz, a Doppler flow velocimetry study was performed to localize the flow of portal vein in its intrahepatic portion, and the cells were infused by guided intravascular injection.

Histological Analysis. The area of fibrosis was determined by picrosirius red staining (11), utilizing the technique of morphometric quantification of collagen density (12). With the capture of ten different areas, an automatic quantification of fibrosis area present in a surface field was performed. Image analysis was done with the software Image-Pro Plus, version 4.1 (Media Cybernetics/USA).

Immunohistochemical Analysis: The rabbit polyclonal antibody anti-SOX 18 was used to identify cells originated from donor bone marrow (13, 14).

Biochemical Analysis. Spectrophotometric methods were used to determine alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TB) and albumin.

Statistical Analysis. The quantitative data were expressed as means \pm standard deviation for variables with symmetric distribution and as medians (minimum-maximum) for variables with asymmetric distribution. The groups were compared using Student's *t*-test and the Mann-Whitney test. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$. The SPSS version 13.0 program was utilized for the analysis.

Results

Of the 24 rats randomized, 12 to each group, 9 rats remained in the cell transplantation group and 8 rats in the control group for analysis, after injection in the portal vein. There were 7 deaths related to portal injection, 4 in the control group and 3 in the group that received bone marrow cells.

Flow cytometry demonstrated that 28.75% of the cells were positive for CD45, 1.65% for CD49b and 31.15% for CD90.

We demonstrated that 75% of treated rats had donor's bone marrow derived cells by immunohistochemical analysis after portal vein injection. Seven rats showed a strong staining with anti-SOX 18 antibody, mainly in the periportal region, while two rats did not display any staining, as show in Figure 1.

In relation to hepatic fibrosis, it was seen that after infusion of bone marrow mononuclear cells via the portal vein, the percentage of fibrosis in the treated group was significant minor in relation to the control group, 1.05% (0.46 to 2.82) versus 2.06% (0.72 to 4.7) (P= 0.036). There were no differences in albumin, total billirubin, AST and ALT levels (Table 1).

An analysis of the rats with repopulation of hepatic tissue by donor's bone marrow cells (n=7) compared with that did not show incorporation added to the control group (n=10), showed that besides a minor percentage of hepatic fibrosis, 0.99% (0.46 to 2.82) versus 1.88% (0.72 to 4.77), with P=0.043, there was also higher levels of albumin, 2.66 ± 0.27 g/dL vs 2.16 ± 0.36 g/dL (P=0.008).

Discussion

Clinical studies conducted in patients with acute myocardial infarct (15, 16) and ischemic stroke (17-19) have demonstrated that intralesional cell therapy is a safe and effective alternative in the treatment of these diseases. Although Lyra et al.(20) and Khan et al.(21) demonstrated in phase I clinical trials that cell transplantation through the hepatic artery in cirrhotic patients does not lead to complications, the only published experimental study that evaluated a local route for cell injection, via the portal vein, was

from Carvalho et al.(22) who were not able to detect a reduction in fibrosis or an improvement of hepatic function.

This is the first experimental study to utilize the portal vein for bone marrow cells transplantation that demonstrated a significant reduction in hepatic fibrosis which was associated with increased serum albumin levels when there was significant hepatic repopulation by donor cells.

It is known that besides the substitution of lesioned hepatocytes and liver repopulation by cells from bone marrow (23, 24), the alteration of hepatic microenvironment by factors derived from the transplanted cells, such as matrix metalloproteinases (25) and arteriogenic cytokines (26), contributes to the histological and functional improvement of the damaged organ. If a greater amount of bone marrow cells are delivered to the lesion site, it is possible that these therapeutic effects could be enhanced.

We demonstrated by immunohistochemical analysis of the liver tissue a great concentration of cells derived from donor's bone marrow, in 75% of the rats submitted to cell therapy, and a greater density of these cells in the periportal area, the site of greatest tissue injury in the bile duct ligation model. It is known, through studies from Sato et al. (27) and Aurich et al. (7), that after a single injection of cells only 1% to 3% of the normal liver is repopulated by donor cells and also that this cell population tends to decline with time (8). The finding of a large population of cells with hepatocyte morphology from the donor, however, reinforces the idea that local injection, is a possible route for cell therapy (6). The fact that two rats did not show a repopulation on hepatic tissue is in consonance with studies such as those from Nakamura et al. (28)

and Quintanilha et al. (29) who demonstrated a greater efficacy in repopulation after various cells injection.

In conclusion, our findings demonstrate that the transplantation of bone marrow derived mononuclear cells via the portal vein can be effective to repopulate damage hepatic tissue, can contribute to the alleviation of fibrosis and improve of hepatic function. Therefore this technique could be applied as an efficacious alternative for patients with chronic liver disease.

References

1. Torok NJ. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2008;43:315-321.
2. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-851.
3. Fleming KM, Aithal GP, Solaymani-Dodaran M, Card TR, West J. Incidence and prevalence of cirrhosis in the United Kingdom, 1992-2001: a general population-based study. *J Hepatol* 2008;49:732-738.
4. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
5. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl* 2004;10:886-897.

6. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:893-899.
7. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
8. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Nioka M, Watanabe T, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007;45:213-222.
9. Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005;38:197-202.
10. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984;65:305-311.
11. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-455.
12. Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-355.
13. Stanojcic S, Stevanovic M. The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:237-241.
14. Pennisi DJ, James KM, Hosking B, Muscat GE, Koopman P. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome* 2000;11:1147-1149.

15. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-95.
16. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-121.
17. Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, et al. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 2005;103:38-45.
18. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57:874-882.
19. de Freitas GR F-d-MM, Bezerra DC, Silva AS, Falcão CH, Gonzales CS, Moreira RC, Haddad AF, Tuche FA, Mesquita CT, Oliveira AA, Araujo MD, Garicochea B, Machado DC, Raupp EF, Andre C, Dohmann HJ, Friederich M. . Safety and feasibility of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in acute ischemic stroke. In: Annual Meeting of the American Academy of Neurology; 2006 April, 2006; San Diego, CA: ; 2006.
20. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007;13:1067-1073.

21. Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao SG, et al. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc* 2008;40:1140-1144.
22. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, Paredes BD, Mannheimer EG, Carvalho FG, Asensi KD, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* 2008;26:1307-1314.
23. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
24. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304-1311.
25. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Murata T, Mizunaga Y, et al. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res* 2007;327:463-470.
26. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543-1549.
27. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.

28. Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, et al. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 2007;133:91-107 e101.

29. Quintanilha LF, Mannheimer EG, Carvalho AB, Paredes BD, Dias JV, Almeida AS, Gutfilen B, et al. Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2008;17:943-953.

Acknowledgment: The authors wish to thank the financial support of CNPq (National Council of Technological and Scientific Development/Brazil).

Table 1. Quantitative analyses of fibrosis and biochemical parameters in Wistar rats with induced fibrosis submitted to bone marrow mononuclear cells treatment and control animals.

Variable	<u>Treatment Group</u> n=9	<u>Control Group</u> n=8	<i>P</i>
Fibrosis,%*	1.05 (0.46 to 2.82)	2.06 (0.72 to 4.77)	0.036 [†]
Albumin, g/dL	2.48±0.42	2.23±0.36	0.231*
TB, mg/dL	4.01±0.86	3.91±0.41	0.785*
ALT, UI/mL	23.7 (10 to 61)	13.45 (8 to 39)	0.277 [†]
AST, UI/mL	81.5 (29.4 to 183.7)	67.1 (45.1 to 110.1)	0.423 [†]

The data are presented as medians (minimum to maximum) or means ± standard deviation. TB= total bilirubin, AST= aspartate aminotransferase and ALT= alanine aminotransferase. *Student's *t* test. [†]Mann-Whitney test.

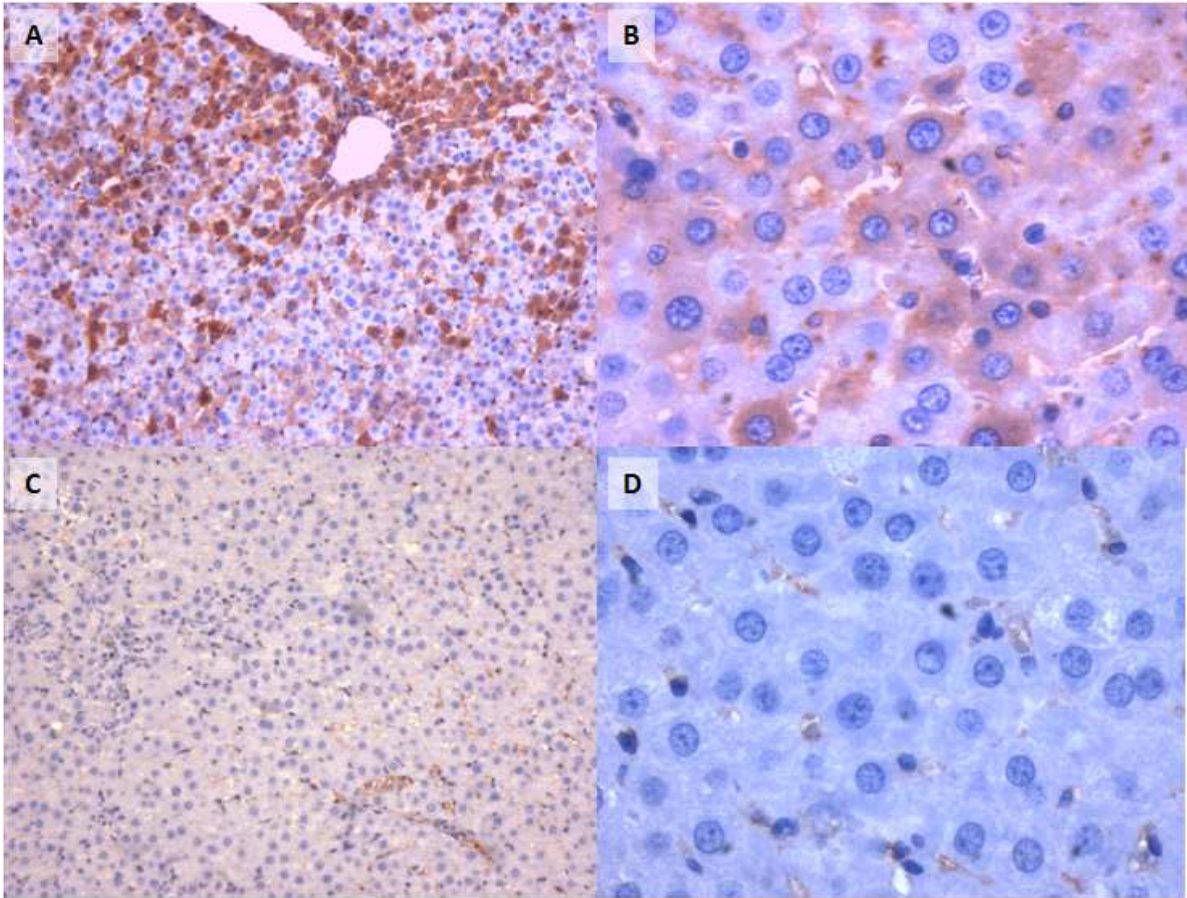


Figure 1. Photomicrography of rat's liver showing anti-Sox 18 antibody staining.

A and B: rat's liver that received transplantation of bone marrow mononuclear cells with 10x and 40x magnification, respectively. C and D: rat's liver of the control group with 10x and 40x magnification, respectively.