

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

**TRANSPLANTE INTRAPORTAL POR VIA PERCUTÂNEA DE CÉLULAS-TRONCO
DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS CIRRÓTICOS: EXEQUIBILIDADE E EFICÁCIA
JURANDI ANTONIO BETTIO**

PORTO ALEGRE

2010

JURANDI ANTONIO BETTIO

**TRANSPLANTE INTRAPORTAL POR VIA PERCUTÂNEA DE CÉLULAS-TRONCO
DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS CIRRÓTICOS: EXEQUIBILIDADE E EFICÁCIA**

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.

Orientador: Dr. Jaderson Costa da Costa

Coorientadores: Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B565i Bettio, Jurandi Antonio

Infusão de células tronco na veia porta de ratos por via percutânea: estudo da exequilidade e eficácia / Jurandi Antonio Bettio. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

64 f.: gráf.

Orientador: Prof^a. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Coorientadores: Prof^a Denise Cantarelli Machado

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

1. CÉLULAS-TRONCO. 2. VEIA PORTA. 3. ADMINISTRAÇÃO CUTÂNEA. 4. PUNÇÕES. 5. FÍGADO. 6. INJEÇÕES. 7. RATOS. 8. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Kupski. IV. Título.

C.D.D. 574.87

C.D.U. 591.436:599.323.4(043.3)

N.L.M. QU 325

JURANDI ANTONIO BETTIO

**TRANSPLANTE INTRAPORTAL POR VIA PERCUTÂNEA DE CÉLULAS-TRONCO
DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS CIRRÓTICOS: EXEQUIBILIDADE E EFICÁCIA**

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.

Aprovado pela Banca Examinador em 30 de março de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Matteo Baldisseroto

Dr. Alfeu de Medeiros Flack Jr

Dr. Jefferson Luis Braga Silva

Dr. Marcelo Garcia Toneto (Suplente)

Dedico este trabalho aos meus amores, Fernanda, Pedro e Clara, por estarem sempre ao meu lado nesta caminhada, não me deixarem desistir nos momentos mais difíceis, aguentar os dias de mau humor e, acima de tudo, me fazerem muito feliz.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivo e Clementina, pelo apoio incondicional em todas as etapas de minha vida e por terem participado como exemplo em minha formação pessoal e acadêmica.

À minha família: Fernanda, Pedro e Clara, por ter me estimulado a realizar o trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pelo estímulo e planejamento estratégico relacionado à pesquisa.

Ao Dr. Fernando Branco Barletta, por sua amizade e grande capacidade de organização técnica e científica e orientação nas linhas de mestrado e doutorado.

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

Ao Dr. Lucas Spadari Maggioni, que, com sua capacidade de organização e habilidade técnica, tornou possível a realização do trabalho.

Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, pelo apoio na elaboração das imagens e realização da análise das amostras do tecido hepático.

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

À minha secretária, Marlene Saidler, pelo inestimável apoio e dedicação.

RESUMO

Introdução: Evidências crescentes têm demonstrado que o transplante de células-tronco pode tornar-se uma terapia eficaz em hepatopatias. A injeção sistêmica de células-tronco tem demonstrado que um percentual significativo dessas células fica retido no pulmão e no baço. Assim, a punção percutânea da veia porta orientada por ultrassonografia com Doppler colorido, em ratos, para administração de células-tronco apresenta-se como uma alternativa. O objetivo deste estudo foi avaliar a exequibilidade da técnica de punção percutânea da veia porta e a eficácia do transplante intraportal de células mononucleares de medula óssea em ratos com cirrose induzida. **Metodologia:** Para a execução do experimento, foram selecionados 24 ratos fêmeas da raça Wistar com cirrose induzida através da ligadura do ducto biliar. Quatorze dias após a ligadura, os animais foram preparados com tricotomia abdominal, sedação e orientação do procedimento por ecografia abdominal com Doppler colorido para facilitar a localização da veia porta. A fração mononuclear obtida da medula óssea de ratos machos doadores foi infundida utilizando uma agulha de gauge 30, com punção direta pela parede abdominal por via trans-hepática até a veia porta, junto do hilo do fígado. No 28º dia do experimento, os ratos foram sacrificados e avaliou-se o repovoamento hepático de células-tronco através da análise imunohistoquímica das células portadoras do cromossoma Y e a quantidade de células através da citometria de fluxo. **Resultados:** Os resultados obtidos através da infusão de células-tronco diretamente na veia porta, orientada por ultrassonografia com Doppler colorido, evidenciaram que, dos 24 ratos estudados, sete animais (29,2%) morreram nas primeiras 24 horas. Houve um significativo repovoamento hepático com células da medula óssea do doador em 77,8% dos ratos estudados e uma eficácia de 31,5%. **Conclusão:** A técnica de punção percutânea da veia porta mostrou-se de fácil execução e com visualização do material no interior do sistema portal durante o procedimento, embora aproximadamente 1/3 dos animais tenham morrido no período relacionado ao procedimento. A infusão da fração mononuclear da medula óssea diretamente na veia porta de ratos cirróticos permitiu a nidação, fusão e/ou fagocitose das células do animal doador no fígado do receptor, sugerindo potencial terapêutico no tratamento da cirrose humana.

Palavras-chave: Hepatócito. Terapia celular. Cirrose hepática. Célula-tronco. Ligadura do ducto biliar.

ABSTRACT

Introduction: There is growing evidence that stem cell transplantation may be an effective therapy to treat liver disease. With systemic delivery of stem cells, a significant proportion of cells are retained in the lung and spleen. Therefore, ultrasound-guided percutaneous portal vein puncture has been tested as an alternative method in rat models. The objective of the present study was to evaluate the feasibility of percutaneous portal vein puncture and the efficacy of intraportal transplantation of bone marrow mononuclear cells in a rat model of cirrhosis.

Method: To carry out the experiment, 24 female Wistar rats with cirrhosis induced by bile duct ligation were used. Fourteen days after ligation, the animals were randomized and then shaved and sedated for the procedure with Doppler ultrasound to facilitate identification of the portal vein. The mononuclear fraction obtained from the bone marrow of male rat donors was infused with a 30-gauge needle through direct abdominal puncture using a transhepatic route running along the liver hilum. On the 28th experimental day, the rats were euthanized. Liver repopulation with stem cells was evaluated through immunohistochemical detection of y chromosome-containing cells. The number of cells was determined using flow cytometry. **Results:** The results obtained with ultrasound-guided delivery of stem cells directly into the portal vein show that of 24 animals studied, seven (29.2%) died in the first 24 h. Significant liver repopulation with donor stem cells was observed in 77.8% of the rats studied, with an efficacy of 31.5%. **Conclusion:** The performance of percutaneous portal vein puncture was simple and enabled visualization of the material inside the portal system during the procedure, although approximately one third of the animals died during the observation period. The delivery of mononuclear stem cells directly to the portal vein of rats with cirrhosis enabled the implantation, fusion and/or phagocytosis of donor cells in the liver of recipients, suggesting therapeutic potential to treat cirrhosis in humans.

Keywords: Hepatocyte. Cell therapy. Liver cirrhosis. Stem cell. Bile duct ligation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental.....	34
Figura 2 - Local exato para a punção percutânea, por via trans-hepática, até a veia porta.	37
Figura 3 - Imagem ecográfica da via biliar distendida com líquido na cavidade abdominal relacionado ao sangramento pós-punção.....	39
Figura 4 - A imagem acima evidencia a distensão da via biliar que desloca a veia porta. Essa modificação anatômica dificulta o acesso para a punção trans-hepática.....	40
Figura 5 - A imagem ecográfica acima permite a visualização das veias porta e cava e a mensuração do calibre portal. Na linha inferior, registra-se o fluxo portal.....	41
Figura 6 - Histograma mostrando o número de eventos e a intensidade de fluorescência (FITC) Para (A) CD45, (B) CD49B, (C) CD90.	42
Figura 7 - Fotomicrografia de fígado de ratos mostrando a marcação para Sox-18 Pela técnica de imuno-histoquímica com contra-coloração pela hematoxilina-eosina.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - comparação por incorporação celular com o percentual de fibrose em ratos Wistar Com cirrose induzida.....	44
---	----

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	<i>Child-Turcotte-Pugh</i>
CTA	Células-tronco adultas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
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	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
OMS	Organização Mundial da 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	<i>Shunt</i> porto-sistêmico transjugular
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

UNOS	<i>United Network for Organ Sharing</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
α -SMA	Actina de músculo liso alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 CIRROSE.....	17
2.1.1 Definição.....	17
2.1.2 Epidemiologia.....	17
2.1.3 Fisiopatogenia.....	18
2.1.4 Evolução e prognóstico.....	20
2.1.5 Transplante hepático.....	21
2.2 CÉLULAS-TRONCO.....	22
2.2.1 Conceito.....	22
2.2.2 Células-tronco embrionárias.....	22
2.2.3 Células-tronco adultas.....	24
2.2.4 Células-tronco e fígado.....	26
3 JUSTIFICATIVA.....	29
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 OBJETIVO GERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	31
5.2 ÉTICA.....	31
5.3 ANIMAIS.....	31
5.4 ANESTESIA E ANALGESIA.....	32
5.5 EUTANÁSIA.....	32
5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
5.7 INDUÇÃO DE CIRROSE.....	34
5.8 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA.....	35
5.9 TÉCNICA PARA INJEÇÃO CELULAR INTRAPORTAL.....	36

5.10	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	38
5.11	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	38
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6	RESULTADOS.....	39
7	DISCUSSÃO.....	45
8	CONCLUSÕES.....	48
9	PERSPECTIVAS.....	49
	Referências	50
	Anexos	59
	ANEXO A- Folha de aprovação na comissão coordenadora do programa de pós-graduação em medicina e ciências da saúde.....	60
	ANEXO B - Folha de aprovação no comitê de ética em pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.....	61
	ANEXO C. Submissão ao periódico <i>Hepatology</i>	62
	ANEXO D. Artigo submetido.....	63

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

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 2 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 5 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 25% enquanto listados trouxeram a necessidade de terapêuticas alternativas. Neste contexto, surge o interesse pelo estudo das células-tronco.

As células-tronco apresentam capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares, podendo representar a solução para esse 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 dessas células quando transplantadas, contribuindo para a melhora do órgão.

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. Esse 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).

Em 1978, a Organização Mundial da 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 esses *shunts* compromete a relação entre os sinusoides hepáticos e os hepatócitos.

2.1.2 Epidemiologia

Estima-se que 0,15% da população norte-americana apresente cirrose, resultando em mais de 25.000 mortes e 373.000 hospitalizações/ano, 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%, explicadas pela redução da prevalência dos principais fatores etiológicos (9).

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 esteato-hepatite 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.

2.1.3 Fisiopatogenia

A fibrose hepática é uma resposta de reparação desencadeada por várias causas, incluindo vírus, doenças autoimunes, metabólicas, colestáticas e tóxicas, na qual as regiões danificadas são encapsuladas por matriz extracelular (MEC). A fibrogênese hepática é um processo complexo, composto por uma sequência de eventos, como 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, em um índice de 3,6 a seis células por 100 hepatócitos. Tipicamente, estão localizadas no espaço perisinusoidal de Disse. Em seu estado quiescente, apresentam depósitos citoplasmáticos de lipídios que servem como principal depósito de vitamina A, apresentando papel fundamental na homeostase do ácido retinoico; também são indispensáveis para manutenção estável dos níveis de matriz da membrana basal nos sinusoides hepáticos, regulando o fluxo sanguíneo e a pressão venosa portal (10). A ativação é a transdiferenciação da célula em um miofibroblasto ativo, ocorrendo em duas fases: uma fase de iniciação, também chamada pré-inflamatória, e outra fase de perpetuação.

A iniciação refere-se 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 e 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. Dentre essas células, a infiltração das células de Kupffer tem papel relevante. Há coincidências com o influxo dessas 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 retinoides pelas células estreladas hepáticas através da ação de citocinas como o 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).

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

A MEC refere-se 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, porém 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 à 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 sinusoides 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 TNF- α , o fator de crescimento de células endoteliais vasculares, entre outros. A liberação controlada dessas citocinas pela MEC é um mecanismo fundamental para manter 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. Além disso, 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. 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).

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 mortalidade estimada de 1% por ano; o estágio dois, com presença de varizes esofágicas sem sangramento ou ascite, apresenta 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 tem 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 (17).

2.1.5 Transplante hepático

O transplante hepático é o único tratamento curativo disponível atualmente. Taxas de sobrevida em 1 ano maior que 85%, em 3 anos em torno de 75% e em 5 anos de 70% (18) fizeram com que essa terapêutica entusiasmasse médicos e pacientes, com expectativas de vida muito maiores em relação à evolução natural da doença.

O grande problema desse tratamento reside na escassez de órgãos doados. Dados da *United Network for Organ Sharing* (UNOS), órgão norte-americano responsável pela regulação de todo o 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 dessa desproporção entre pacientes necessitando de transplante hepático e 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 6.505 pacientes em lista de espera (19).

2.2 CÉLULAS-TRONCO

2.2.1 Conceito

Células-tronco são definidas como células clonogênicas, que apresentam capacidades de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Essas células estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento e provavelmente existem em todos os organismos multicelulares (20).

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 esses processos celulares são resultados diretos da presença de células-tronco (21).

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 dessas células desde a década de 1970, quando Leroy Stevens e Barry Pierce isolaram células de teratomas testiculares de camundongos (22).

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 extraembrionárias, 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. Essas células, quando mantidas em culturas na presença de fatores tróficos, mantêm-se indiferenciadas (autorrenovação) e formam teratomas (tumores com células de todos os folhetos embrionários) quando injetadas sob a pele de camundongos imunodeficientes, demonstrando sua pluripotencialidade (23).

As células-tronco embrionárias, para serem transplantadas, necessitam de diferenciação *in vitro*, já que, conforme 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 (24), gerando células produtoras de mielina (25), precursores neurais capazes de gerar *in vivo* astrócitos, oligodendrócitos e neurônios funcionantes (25), células produtoras de insulina (26), músculo cardíaco (27) e neurônios dopaminérgicos capazes de aliviar os sintomas de um modelo animal de doença de Parkinson (28).

Hepatócitos também já foram gerados a partir de células-tronco embrionárias. Essas células hepáticas apresentaram alta atividade de remoção de amônia e secreção de albumina em cultura (29) e têm servido como base para o desenvolvimento de fígados artificiais híbridos (30).

Ainda não existem protocolos clínicos que utilizem células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. A principal razão para isso é a questão de segurança das células. Em modelos animais, mostrou-se que, quando transplantadas, frequentemente havia formação de teratomas ou teratocarcinomas no órgão-alvo. Existe também a questão ética envolvida, já que para obtenção dessas 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 confirmadas pelo Superior Tribunal Federal (STF) em 28 de março de 2008. No entanto, é preciso que sejam atendidas as condições de obtenção através de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não

usados no procedimento, inviáveis, congelados há 3 anos ou mais e com consentimento dos progenitores.

2.2.3 Células-tronco adultas

As células-tronco adultas (CTA), ou melhor denominadas de células-tronco somáticas, 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-específicas e possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação em tecidos celulares especializados ao sofrer processo de divisão celular (31).

Já se identificaram CTA em vários tecidos diferenciados, como medula óssea, córnea, retina, fígado, pele, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, coração e cérebro (32,33). Elas são bastante raras e estima-se que uma em 10.000 células da medula óssea seja uma célula-tronco hematopoiética (21).

O paradigma clássico de que a diferenciação de uma CTA é restrita à linhagem de seu órgão específico tem mudado. Há possibilidade de manutenção nessas células de algum grau de plasticidade que permite seu desenvolvimento entre diferentes linhagens, tecidos e camadas germinativas (34). Vários estudos já demonstraram que células não selecionadas da medula óssea, depois de transplantadas, formaram tecido não linfo-hematopoiético, como fibras musculares (35), hepatócitos (36) e tecido neural (37). Os mecanismos que permitem a transdiferenciação das CTA ainda não são conhecidos, e já existem estudos que questionam essa teoria, sugerindo que a fusão celular pode explicar os achados descritos anteriormente (38).

Tanto a plasticidade quanto a possibilidade de utilização autóloga dessas células, além das questões ético-religiosas e de segurança envolvidas com as células-tronco embrionárias, têm 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 ovais.

As células-tronco mesenquimais são encontradas no estroma de vários órgãos. Foram primeiramente descritas 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 (39). Podem ser obtidas também da polpa dentária (40), tecido adiposo, tendões, sangue do cordão umbilical e placenta (41). 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 dessas células em tecido ósseo, neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos e células musculares, compreendendo os três folhetos germinativos (42-46).

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 (47).

Os mecanismos de ação das CTA ainda são discutidos. Há evidências de que o principal mecanismo de atuação das CTA 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 (48,49). 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 a angiogênese (50).

O estudo das CTA em doenças cardiovasculares está em estágio avançado, com vários protocolos clínicos já realizados e publicados. Com relação à doença coronariana aguda, em 2001, na Alemanha, Bodo Strauer realizou injeção de células mononucleares de medula óssea (CMMO) por via intracoronariana com segurança em paciente após infarto agudo do miocárdio, seguida 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% (51). A seguir, foram realizados

estudos randomizados de injeção de CMMO intracoronarianas (52-55), demonstrando aumento significativo da fração de ejeção, redução da área de infarto e melhor remodelamento cardíaco nos pacientes submetidos a terapia celular. Atribui-se esse 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, estudos clínicos desenvolvidos, como o de Martino e cols., não têm demonstrado até o momento diferenças significativas obtidas com a terapia celular intracoronariana (56).

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 o uso de células-tronco no acidente vascular isquêmico (57,58) e na doença de Parkinson (28). A partir disso, 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 (59-62), 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 (63-65).

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 (66).

Em razão dessa 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 (67).

O interesse do uso de células-tronco para doenças hepáticas surgiu no momento em que foram identificados potenciais progenitores hepáticos dentro da medula óssea. Essas células poderiam ser ativadas em resposta à lesão hepática. Estudos identificaram o “tráfego” de células-tronco hematopoiéticas durante a injúria hepática (68).

Lagasse e cols. demonstraram que células-tronco hematopoiéticas poderiam originar hepatócitos em camundongos submetidos a injúria por irradiação e seriam capazes de sintetizar enzimas deficientes (69).

Sakaida e cols., 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 4 semanas após o transplante celular detectou-se redução significativa da fibrose (70).

Takeda e cols., em 2005, comprovaram que, após o transplante de células-tronco hematopoiéticas em ratos com cirrose induzida, houve uma completa recuperação na produção de albumina (71).

Em outro estudo experimental, realizado por Sakaida em 2005, verificou-se a repopulação hepática por células derivadas da linhagem de células-tronco do doador, diferenciando-se 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 (72).

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 (73).

Terai 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 (74).

Já existem três estudos clínicos de fase I que demonstram a segurança do transplante de células-tronco de medula óssea em pacientes cirróticos. Em nenhum estudo houve complicações

relacionadas à infusão celular, e observou-se discreta melhora da função hepática dos pacientes (75-77).

Esses resultados corroboraram ideia 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 essa terapia, como cirróticos ou pacientes com insuficiência hepática aguda.

3 JUSTIFICATIVA

A terapia celular com células-tronco vem se mostrando promissora em áreas da medicina como neurologia e cardiologia, que já apresentam ensaios clínicos com resultados animadores. Nas hepatopatias, há estudos experimentais em quantidade crescente, porém os mecanismos de ação, segurança e eficácia não estão completamente elucidados. A possibilidade de empregar animais de pequeno porte no estudo da cirrose experimental defronta-se com a dificuldade técnica de injeção das células-tronco na veia porta, visto as dimensões reduzidas da estrutura. Assim, a possibilidade de associar as técnicas de imagem não-invasiva com o objetivo de guiar e orientar o acesso percutâneo da veia porta torna-se uma possibilidade atrativa para o desenvolvimento desses estudos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Constitui objetivo do presente estudo avaliar a exequibilidade da punção percutânea da veia porta com o auxílio da ultrassonografia com Doppler colorido e a eficácia da injeção intraportal de células-tronco em ratos portadores de cirrose induzida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a exequibilidade da punção da veia porta por via percutânea guiada por ultrassonografia;
2. Avaliar a morbimortalidade decorrente do procedimento de punção percutânea da veia porta;
3. Conhecer a fenotipagem da fração mononuclear da medula óssea dos animais doadores;
4. Verificar, no fígado do animal receptor, a presença de células do doador após infusão da fração mononuclear da medula óssea como indicador de sucesso do procedimento;
5. Identificar a distribuição intra-hepática das células transplantadas;
6. Avaliar a fibrose tecidual nos animais com cirrose experimental antes e após a terapia celular.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Delineamento: estudo experimental *in vivo*.

Fator de exposição: Descrição da técnica de infusão percutânea intraportal de células-tronco.

Desfecho: Exequibilidade da técnica empregada e eficácia do transplante pela avaliação da nidação, fusão e/ou fagocitose das células-tronco do animal doador no parênquima hepático do rato receptor cirrótico.

5.2 ÉTICA

Todos os procedimentos adotados durante as técnicas envolvendo os animais estão de acordo com o que regulamenta a Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional, por meio do Decreto nº 6.899, publicado no Diário Oficial da União no dia 15 de julho de 2009. O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e pelo 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 16 g, receberam água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com cama de maravalha de pinus selecionado, devidamente identificadas, com fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro (6h/18h). A dieta e hidratação foram revisadas diariamente, e a troca das camas foi efetuada três vezes por semana.

5.4 ANESTESIA E ANALGESIA

Após pesados em balança analítica (Marte®, AM220), os ratos foram anestesiados com solução de cetamina 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 1 semana.

5.5 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada através de injeção intracardíaca de cloreto de potássio com anestesia geral prévia, método 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 DELINEAMENTO 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 CMMO na concentração de 1×10^7 células mononucleares (grupo tratado), provenientes de ratos machos, via veia porta, orientada por ultrassonografia com Doppler colorido. Um grupo controle 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 imuno-histoquímica.

Um diagrama esquemático das etapas descritas acima é apresentado na Figura 1.

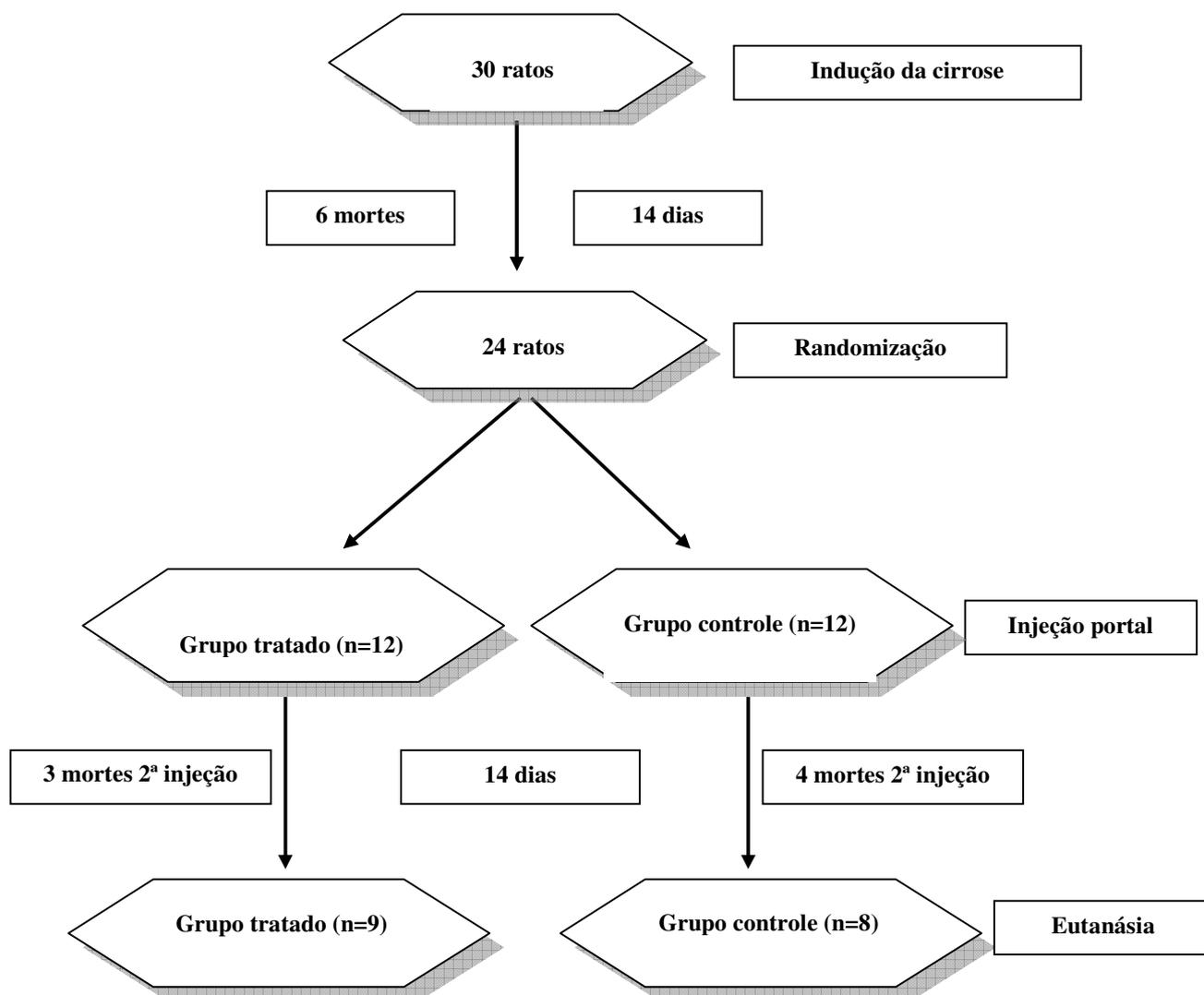


Figura 1 - Fluxograma do delineamento experimental

5.7 INDUÇÃO DE CIRROSE

A cirrose hepática foi induzida em 30 animais através da ligadura do ducto biliar, segundo modelo proposto por Kountouras e cols., em 1984, no qual a ligadura do ducto biliar induz cirrose em um período de 15 a 28 dias (78).

Após anestesia, procedeu-se à incisão da pele na linha mediana, desde o apêndice xifoide até a cicatriz umbilical. Foram expostos os órgãos (estômago, fígado e intestino delgado) e o ducto biliar comum, com abaixamento do duodeno; prosseguiu-se à dupla ligadura do ducto biliar comum, colocada o mais proximal e o 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. Dos 30 animais submetidos ao procedimento, seis morreram nas duas primeiras semanas, restando 24 ratos para o processo de randomização (Figura 1).

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 cetamina (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 para possibilitar 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, em um volume de cerca de 4 mL e transferido para outro tubo de 15 mL, contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade de 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 Tripan em câmara de Neubauer.

Após contagem, a solução foi dividida em alíquotas de 1×10^7 células para realizar injeção portal e uma alíquota para fenotipagem por citometria de fluxo com marcadores CD 45, CD 49b, e CD 90.

5.9 TÉCNICA PARA INJEÇÃO CELULAR INTRAPORTAL

Para realização da injeção celular intraportal percutânea, procedeu-se da seguinte maneira:

- 1- Previamente à injeção percutânea, realizou-se tricotomia da parede abdominal, junto ao flanco direito, antes da anestesia, com aparelho descartável para tricotomia (Gillette);
- 2- Após, foi realizada anestesia do rato com solução de cetamina 80% e clorpromazina 20% por via subcutânea;
- 3- Após contagem celular em câmara de Neubauer, cada fração de 1×10^7 células foi diluída em PBS, perfazendo volume total de 0,3 mL, e acondicionada em seringas de 1,0 mL;
- 4- Utilizou-se uma agulha 0,30/13 de gauge 30 (agulha de heparina) para a punção direta da veia porta por via percutânea, através do fígado;
- 5- Após o acoplamento da agulha com a seringa contendo as células-tronco, foi utilizado álcool absoluto para fazer assepsia da parede abdominal do rato;
- 6- Em seguida, foi colocada xilocaína gel na parede abdominal para fazer o contato entre a pele e o transdutor da ultrassonografia;
- 7- Utilizando aparelho de ecografia marca Philips HD-11 XE, com transdutor vascular, na frequência de 5-12 MHz, foi realizado estudo dopplervelocimétrico colorido para avaliação da vascularização hepática;
- 8- Localização do fluxo da veia porta em sua porção intra-hepática (Figura 2);
- 9- Com as mãos livres, sem seguir o orientador eletrônico do equipamento, foi localizado o ponto exato da introdução da agulha na parede abdominal, trans-hepática, até a veia porta, sempre observando os ratos que tiveram a ligadura biliar devido à distensão da vesícula biliar e do colédoco;

- 10- Após a localização, procedeu-se à infusão celular em 12 animais por meio de injeção intravascular orientada e, nos 12 animais controles, injeção de solução salina;
- 11- Durante o procedimento, visualizaram-se pequenos pontos ecogênicos, relacionados ao conteúdo do líquido injetado no interior do sistema portal intra-hepático, migrando até a periferia do parênquima do fígado;
- 12- Retirou-se a agulha;
- 13- Em alguns casos em que a vesícula biliar estava muito distendida pela ligadura do colédoco, observava-se pequena quantidade de líquido livre, estando relacionado a sangramentos no interior da cavidade abdominal;
- 14- Ao término do procedimento, os animais eram recolocados em suas gaiolas e monitorados.

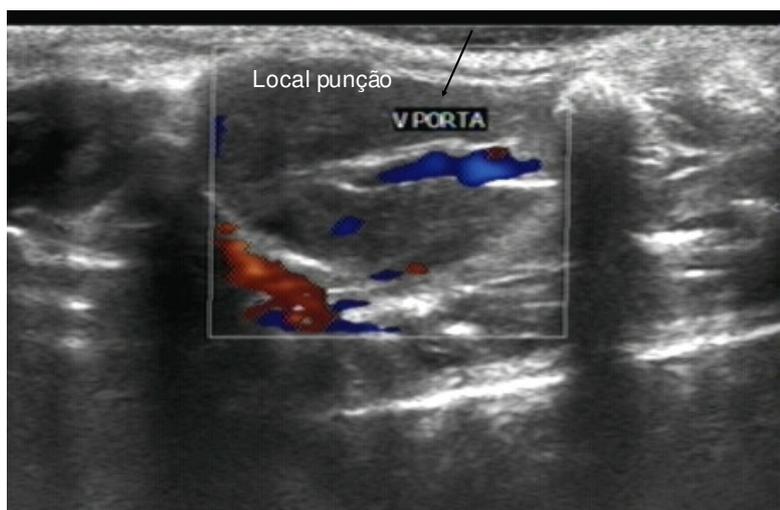


Figura 2 - Local exato para a punção percutânea, por via trans-hepática, até a veia porta.

5.10 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise imuno-histoquímica foi realizada utilizando o anticorpo policlonal de coelhos Anti-Sox 18 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), 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 (79,80). O objetivo da imuno-histoquímica é verificar quais células no tecido hepático de ratos fêmeas são provenientes dos doadores machos, demonstrando a nidação, fusão e/ou fagocitose das células transplantadas.

5.11 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 e tamanho de efeito de, no mínimo, 1,7, estimou-se que eram necessários nove animais no grupo controle e no grupo submetido a terapia celular. Essa estimativa foi realizada utilizando o “Samples” do programa PEPI, versão 3.0 (JH Abranson, PM Gahlinger), 1993-9.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram descritos por frequências absolutas e relativas. Para comparação dos grupos, foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados com o programa SPSS, versão 13.0.

6 RESULTADOS

Do total de 24 ratos, a metade realizou injeção portal de células mononucleares da medula óssea, e a outra metade, injeção salina. Ocorreram sete mortes nas primeiras 24 h após a injeção (29,2%), sendo três no grupo da terapia celular (25%) e quatro no grupo controle (33,3%), relacionadas diretamente ao procedimento, sem significância estatística (teste exato de Fisher; $p = 1,000$); a mortalidade relacionada ao procedimento decorreu, mais frequentemente, de sangramento intra-abdominal, o que pode ser identificado na ultrassonografia (Figura 3).

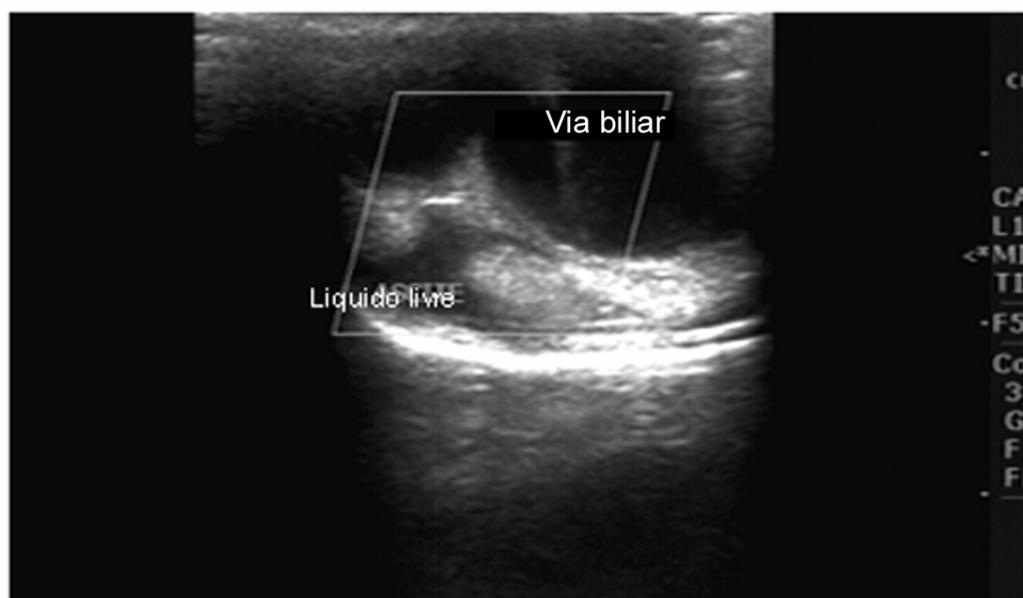


Figura 3 - Imagem ecográfica da via biliar distendida com líquido na cavidade abdominal relacionado ao sangramento pós-punção.

Após a ligadura da via biliar para causar dilatação e consequente cirrose, houve uma compressão do parênquima hepático e maior dificuldade para puncionar a veia porta por via trans-hepática (Figura 4).

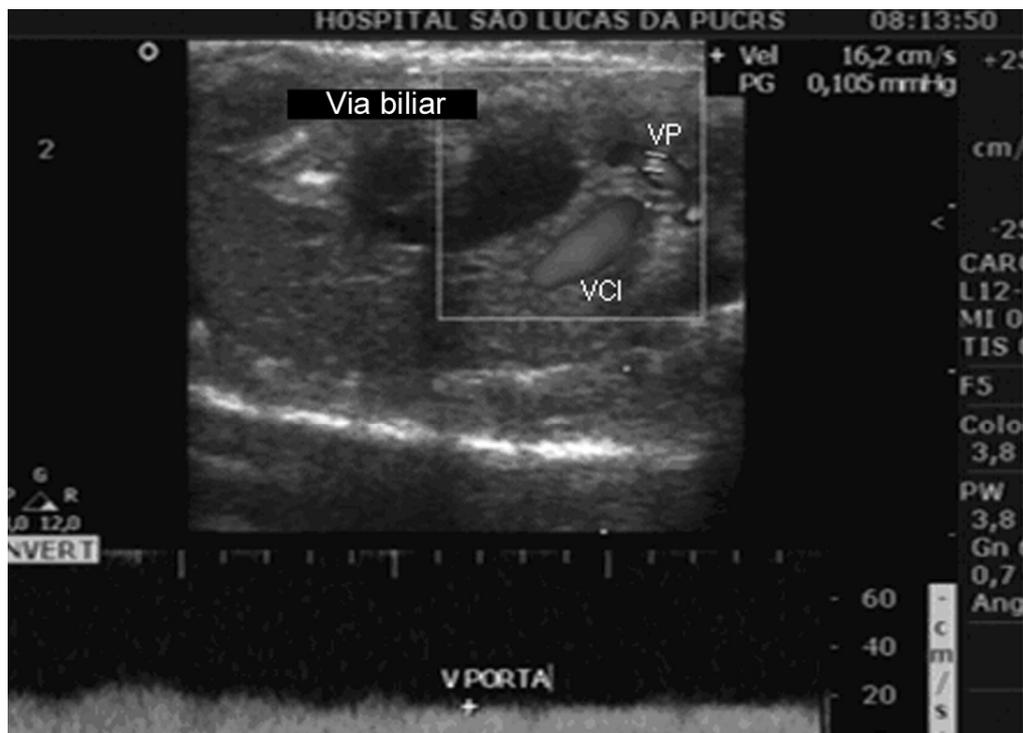


Figura 4 - A imagem acima evidencia a distensão da via biliar que desloca a veia porta. Essa modificação anatômica dificulta o acesso para a punção trans-hepática.

Também foi mensurado por ultrassonografia com Doppler colorido o calibre da veia porta dos ratos durante a execução de experimento, obtendo-se valores do diâmetro portal entre 1,6 e 1,9 mm (Figura 5).

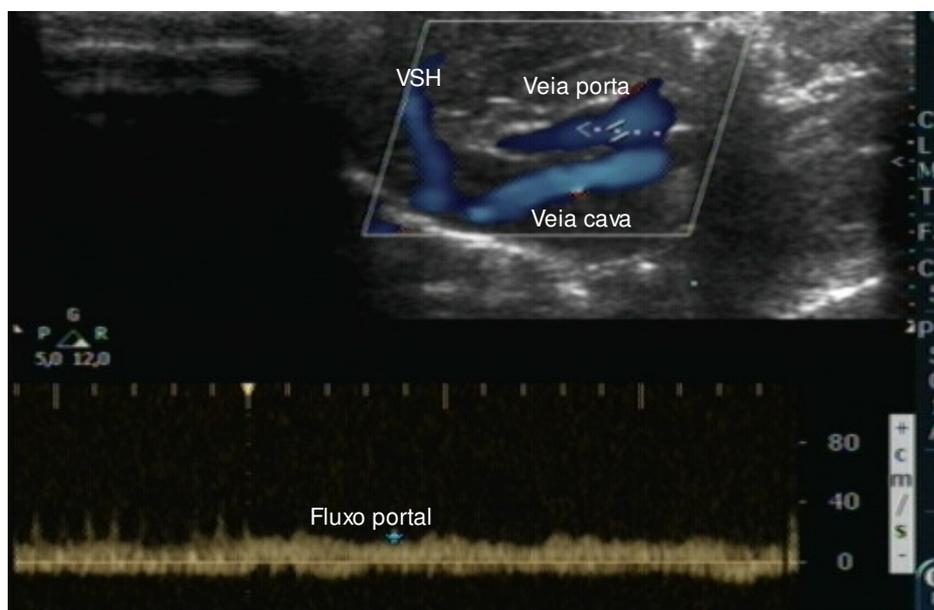


Figura 5 - A imagem ecográfica acima permite a visualização das veias porta e cava e a mensuração do calibre portal. Na linha inferior, registra-se o fluxo portal.

Restaram oito ratos no grupo controle e nove ratos no grupo tratado, que foram submetidos a eutanásia 14 dias após a injeção portal para análise final.

A análise imuno-histoquímica do tecido hepático do receptor demonstrou que o percentual de repovoamento das CMMO na veia porta por via percutânea, orientada por ultrassonografia, apresentou uma eficácia de 77,8% (7/9), identificando-se as células do doador no órgão receptor.

A caracterização fenotípica das células mononucleares da medula óssea utilizadas no grupo tratado foi determinada por citometria de fluxo e demonstrou que 31,5% 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, adequado aos objetivos do estudo.

A Figura 6 apresenta o histograma dos dados descritos.

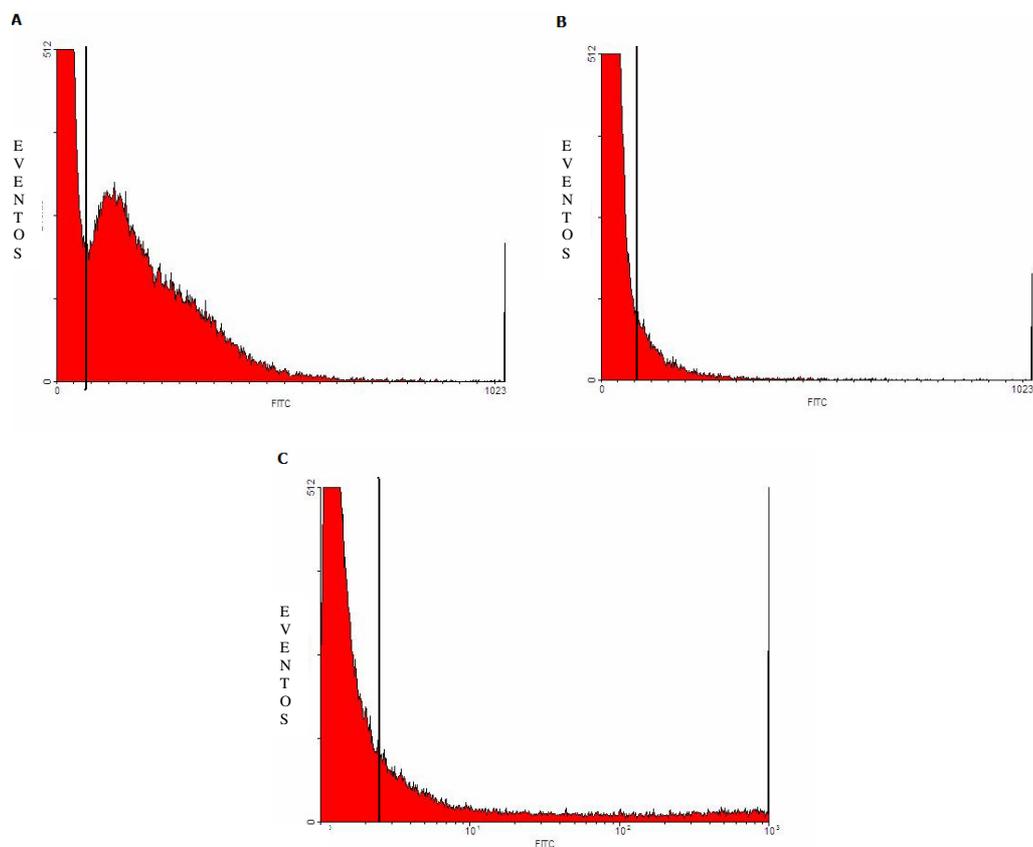


Figura 6 - Histograma mostrando o número de eventos e a intensidade de fluorescência (FITC) para (A) CD45, (B) CD49b, (C) CD90.

Fígados de ratos que receberam transplante celular foram submetidos a imuno-histoquímica com anticorpo anti-Sox 18 para verificar a incorporação de células provenientes do doador macho. Entende-se por incorporação de células a nidação, fusão e/ou fagocitose dessas células no parênquima hepático do animal receptor.

A análise do tecido hepático demonstrou que a injeção de CMMO na veia porta evidenciou que, dos nove ratos que receberam a infusão celular, sete apresentaram forte marcação do anti-Sox 18, o que representa uma eficácia de 77,8% do procedimento para incorporação das células do doador no órgão receptor (Figura 7), principalmente em região periportal. Em dois animais, não foram identificadas células que expressassem o marcador anti-Sox 18.

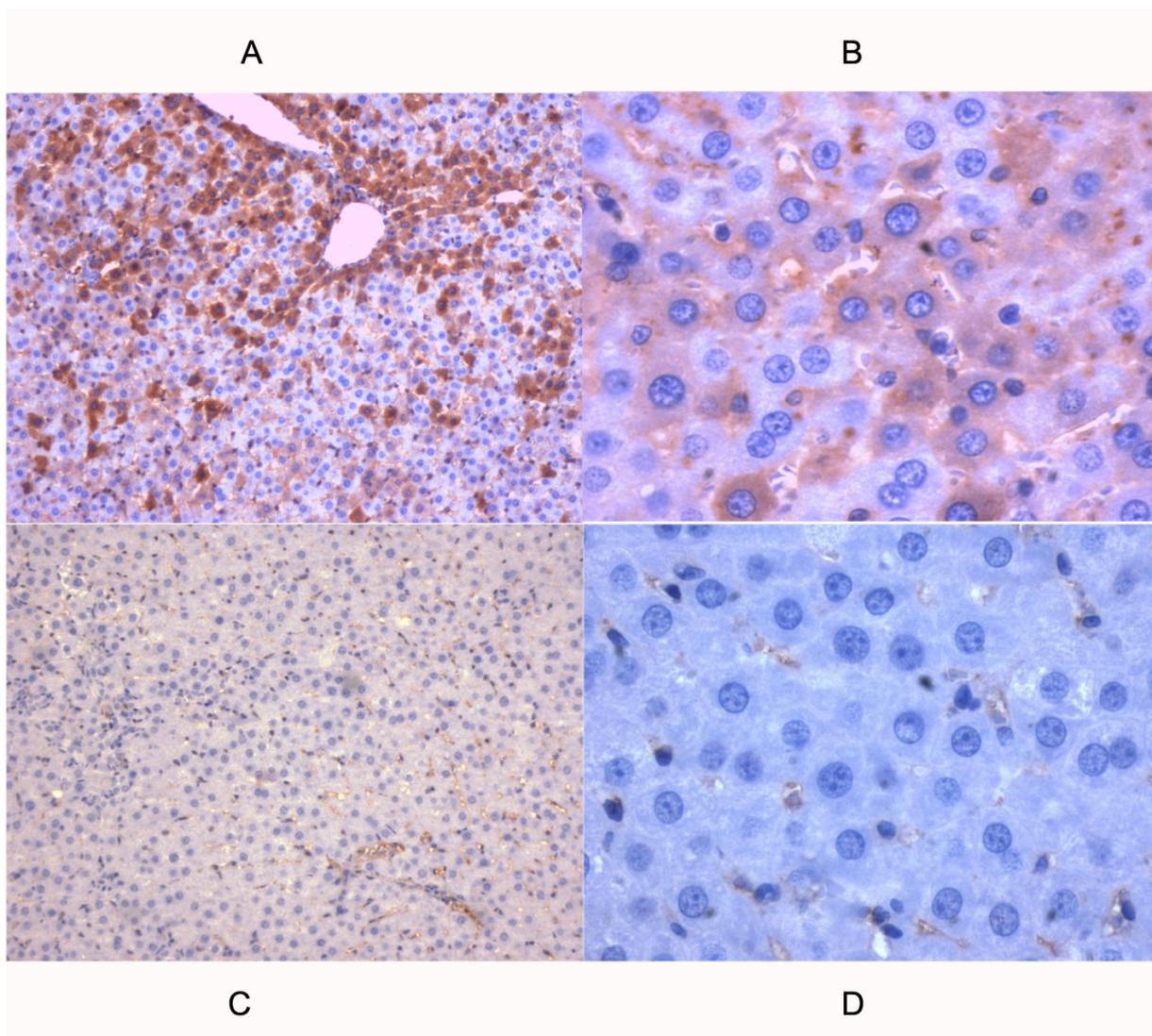


Figura 7 - Fotomicrografia de fígado de ratos mostrando a marcação para Sox-18 pela técnica de imuno-histoquímica com contra-coloração pela hematoxilina-eosina.

Nota - A e B representam fígados de ratos que receberam transplante de células mononucleares de medula óssea de 10x e 40x, respectivamente, onde se observa a marcação cromógena para Sox 18; C e D representam fígados de ratos do grupo controle com aumento de 10x e 40x, respectivamente.

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 esse 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 1).

Tabela 1 - Comparação por incorporação celular com o percentual de fibrose em ratos Wistar com cirrose induzida

Variável	<u>Células Sox-18⁺</u> n = 7	<u>Células Sox-18⁻</u> n = 10	
Fibrose, %	0,99 (0,46 a 2,82)	1,88 (0,72 a 4,77)	0,043†

7 DISCUSSÃO

A exequibilidade e a eficácia da técnica proposta foram satisfatórias, pela alta taxa de incorporação celular no parênquima hepático, mesmo considerando a alta mortalidade, consequente à punção direta da veia porta por via percutânea e trans-hepática.

A inexistência de uma técnica de infusão diretamente no sistema portal ou arterial em ratos constituiu a motivação da execução do presente experimento. Em se tratando de um procedimento de elevada acurácia, utilizou-se a ultrassonografia com Doppler colorido como um recurso para visualizar a anatomia venosa portal e, por conseguinte, que esses objetivos facilitassem a infusão de células-tronco diretamente no sistema portal.

Um dos resultados importantes a ser considerado nesta pesquisa foi de que houve alta mortalidade dos ratos puncionados. Esse alto índice de mortalidade pode estar relacionado à alteração anatômica causada pela distensão da vesícula biliar, em função da ligadura do colédoco e consequente dilatação.

O calibre da veia porta dos ratos, avaliado com o auxílio da ultrassonografia com Doppler colorido, e o fluxo portal auxiliam na localização do vaso, por ser extremamente pequeno (1,6 a 1,9 mm) comparado com 4,0 a 6,0 mm de animais de maior porte e 8,0 a 10,0 mm em seres humanos. Isso traduz uma grande dificuldade técnica para a infusão intraportal de células-tronco. Provavelmente em decorrência dessa limitação técnica, não se encontram na literatura científica trabalhos utilizando essa abordagem percutânea da veia porta em ratos Wistar.

A despeito de ter ocorrido um elevado índice de mortalidade pelo motivo acima exposto, ressaltamos que, em 16 ratos, a técnica de punção percutânea foi satisfatória quando consideramos a incorporação das células mononucleares da medula óssea do animal doador no parênquima hepático do rato cirrótico receptor. A sobrevivência de aproximadamente 70% dos animais, aliada à eficácia do transplante celular, permite considerar essa técnica de extrema utilidade para estudos posteriores.

Ainda relativamente aos resultados obtidos, destacamos que houve 77,8% de incorporação celular, índice satisfatório com a técnica de acesso à veia porta empregada, diferentemente dos estudos de Sato e cols. (46) e Aurich e cols. (81), nos quais, após uma injeção simples celular,

apenas 1 a 3% do fígado normal foi repovoado pelas células do doador. Além disso, essa população celular tende a decair com o tempo (82).

A fenotipagem das células mononucleares injetadas demonstrou que 31,5% das células transplantadas apresentavam marcadores de células-tronco hematopoiéticas (CD 90), enquanto apenas 1,65% das células apresentavam marcadores de células epiteliais, plaquetas e linfócitos (CD 49b), indicando que a população celular injetada estava adequada aos objetivos do estudo.

Outro resultado obtido que justifica o êxito da técnica foi a constatação de que, além da evidência de que as células derivadas da medula óssea do doador nidaram, no fígado de quase 80% dos animais submetidos a terapia celular a maior densidade celular localizou-se na área periportal, que é o local de maior injúria tecidual.

A observação de uma grande população de células com morfologia de hepatócitos provenientes do doador, portanto, reforça a ideia 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 (83). O fato de não ter sido observada incorporação celular em dois animais está de acordo com outros estudos, como o de Nakamura e cols. (84) e o de Quintanilha e cols. (85), que evidenciaram maior eficácia na repopulação após injeções celulares sucessivas. Assim, embora haja maior probabilidade de êxito com a técnica de injeção intraportal, provavelmente cerca de 1/5 dos animais necessitariam de infusões adicionais

Observamos melhora da fibrose após a infusão celular. Yamamoto e cols. (86), 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 o de Carvalho e cols. (87), 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 (88). É possível que a infusão da fração mononuclear de células de medula óssea seja estabelecida com terapêutica eficaz para hepatopatias crônicas, pois nela encontramos também a presença de células produtoras de fatores de crescimento. Estudos adicionais são necessários, e o estabelecimento da técnica de punção percutânea da veia porta em ratos com cirrose experimental

constitui-se em um instrumento de estudo que poderá substanciar o potencial terapêutico das células-tronco na cirrose humana.

8 CONCLUSÕES

As observações do estudo da infusão intraportal de CMMO em modelo de cirrose induzida em ratos permitem concluir que:

1. A técnica de injeção de células-tronco diretamente na veia porta por via transcutânea e guiada por ultrassonografia revelou-se exequível;
2. A mortalidade relacionada ao procedimento foi de 29,2%; as dificuldades técnicas foram decorrentes do reduzido diâmetro da veia porta (1,3 a 1,6 mm) e da dilatação da vesícula biliar em razão da técnica de cirrose experimental utilizada;
3. A fenotipagem das células mononucleares injetadas demonstrou que 31,5% das células transplantadas apresentavam marcadores de células-tronco hematopoiéticas;
4. A injeção intraportal de CMMO por via percutânea mostrou a incorporação das células do animal doador em 77,8% dos animais receptores com cirrose experimental;
5. A maior densidade das células injetadas ocorreu no espaço periportal, com redução da fibrose tecidual.
6. Houve redução significativa de fibrose tecidual após o transplante intraportal de CMMO.

9 PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento da técnica de injeção intraportal por via percutânea de células-tronco da medula óssea em ratos com cirrose experimental, descortina-se uma série de possibilidades de estudos. Assim, pretendemos evoluir na investigação da regeneração do tecido hepático, tipos celulares, resposta bioquímica e funcional. Além disso, em se tratando de uma técnica inédita, esperamos reproduzir os achados obtidos em animais de maior porte com a veia porta de maior diâmetro, reduzindo os níveis de complicação no momento da punção percutânea.

O avanço no conhecimento básico do potencial terapêutico das células-tronco na cirrose hepática é necessário para que essa técnica seja validada no tratamento de cirrose em humanos, dentro de padrão ético e com bases científicas adequadas. Esperamos, no futuro, aplicar essa técnica de punção percutânea da veia porta no tratamento de pacientes com cirrose utilizando células-tronco, visto que esse procedimento em seres humanos já é realizado em larga escala nos procedimentos de radiologia intervencionista para o tratamento de algumas patologias hepáticas.

REFERÊNCIAS

1. Török 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. Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. Deaths: Final Data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 2008;56:1-120.
8. WHO. Mortality Database. 2006 Available from: <http://www.who.int/healthinfo/morttables/en/inex.html>.
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. Matrix 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 matrix. *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. 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.
18. 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.
19. Registro Brasileiro de Transplante; 2008 Janeiro/Junho. Report No.: Ano XIV- Nº1.
20. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-582.
21. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-168.
22. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet* 2006;7:319-327.

23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
24. 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.
25. Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999;285:754-756.
26. 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.
27. 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.
28. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002;418:50-56.
29. 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.
30. 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.
31. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000;287:1431-1433.
32. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-155.
33. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-1710.

34. Quesenberry PJ, Colvin GA, Lambert JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. *Blood* 2002;100:4266-4271.
35. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
36. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
37. 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.
38. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904.
39. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001;19:180-192.
40. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
41. 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.
42. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
43. Galmiche MC, Koteliansky VE, Brière J, Hervé 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.
44. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-1284.

45. 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.
46. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.
47. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-648.
48. Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, Deminière C, Xue R, Delmas Y, 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.
49. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-705.
50. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-1084.
51. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001;126:932-938.
52. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, 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.
53. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-148.
54. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, 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.

55. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, 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.
56. Martino HF, Oliveira PS, Assunção E, Villela R, Gaze M, Costa PC, et al. [Cell therapy in dilated cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:390-392.
57. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002;1:92-100.
58. Savitz SI, Rosenbaum DM, Dinsmore JH, Wechsler LR, Caplan LR. Cell transplantation for stroke. *Ann Neurol* 2002;52:266-275.
59. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000;55:565-569.
60. Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, et al. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 2005;103:38-45.
61. 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.
62. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005;57:874-882.
63. Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005;11:551-555.
64. Kirik D, Björklund A. Histological analysis of fetal dopamine cell suspension grafts in two patients with Parkinson's disease gives promising results. *Brain* 2005;128:1478-1479.
65. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710-719.

66. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53.
67. Berenguer M, Prieto M, Rayón JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology* 2000;32:852-858.
68. Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:156-164.
69. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
70. 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.
71. Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, 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.
72. 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.
73. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CC14 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.
74. 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.
75. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, 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.

76. Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, 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.
77. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
78. 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.
79. Stanojić S, Stevanović M. The human SOX18 gene: cDNA cloning and high resolution mapping. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:237-241.
80. Pennisi DJ, James KM, Hosking B, Muscat GE, Koopman P. Structure, mapping, and expression of human SOX18. *Mamm Genome* 2000;11:1147-1149.
81. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
82. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007;45:213-222.
83. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:893-899.
84. Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, et al. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 2007;133:91-107 e1.
85. Quintanilha LF, Mannheimer EG, Carvalho AB, Paredes BD, Dias JV, Almeida AS, et al. Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2008;17:943-953.

86. 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.
87. 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.
88. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Murata T, 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.

ANEXOS

ANEXO A. 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

Porto Alegre, 06 outubro de 2006.

Ao Pós-Graduando
Jurandi Antonio Bettio
N/Faculdade

Prezado Pós-Graduando:

Informamos que a proposta de dissertação intitulada "Estudo morfo-funcional do fígado após transplante de células tronco da medula óssea no modelo experimental de ratos com 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. Jaderson Costa da Costa

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 B. Folha de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul



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 C. Submissão ao periódico *Hepatology*

ScholarOne Manuscripts

Página 1 de 1



Hepatology

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)SCHOLARONE™
Manuscripts[Main Menu](#) → [Corresponding Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#)

You are logged in as Lucas Maggioni

Submission
ConfirmationThank 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, ChristianAuthors: 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 D. 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@clinpson.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**

Jurandi Antonio Bettio

Av. Ipiranga, 6690, conj. 805, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

55-51333770950

jurandi@clinoston.com.br

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 thanks the financial support of CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development/Brazil).