



**FIOCRUZ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**



**UFBA**

**Tese de Doutorado**

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM LESÕES  
HEPÁTICAS CRÔNICAS EM CAMUNDONGOS**

**SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA**

Salvador - Bahia - Brasil  
2007



FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**



UFBA

**Tese de Doutorado**

**ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM LESÕES  
HEPÁTICAS CRÔNICAS EM CAMUNDONGOS**

Orientadora: Dra. MILENA B. P. SOARES

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Doutora  
em Patologia Experimental.

**SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA**

Salvador - Bahia - Brasil  
2007

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ  
Salvador-Bahia

Oliveira, Sheilla Andrade de  
O48e Estudo do potencial terapêutico de células mononucleares de medula óssea em lesões hepáticas crônicas em camundongos.[manuscrito] . / Sheilla Andrade de Oliveira. - 2007.  
179 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

Orientador: . Dr<sup>a</sup>.: Milena B. P.Souares, Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

1.Terapia celular. 2. Fibrogênese hepática . 3. Tetracloreto de carbono. 4. *Schistosoma Mansoni*. 5. Camundongos. I. Título.

CDU 547.412.135: 616.995.122

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

---

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Dr. Júlio César Voltarelli

Professor Titular

FMRP-USP

---

Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves

Professor Titular

FMUSP

---

Dr. Paulo Lisboa Bittencourt

Professor Colaborador

UFBA

---

Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Pesquisador Titular

FIOCRUZ

---

Dr<sup>a</sup> Milena Botelho Pereira Soares

Pesquisadora Associada

FIOCRUZ

*“A ciência é um conjunto de verdades  
provisórias...”*

*Frederico G.C. Abath*

**Ao meu filho Henrique Siqueira  
Carneiro Filho, razão de tudo.**

**A minha família e a Vitor V.  
Maffli pelo amor e dedicação.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Milena B. P. Soares pelo apoio, incentivo e por me guiar com maestria nos caminhos da ciência. Para ela fica o registro de um agradecimento especial e de minha admiração não só pela mestra, mas também pela amiga que nos tornamos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos notável em determinação e em conhecimento, agradeço por todo o carinho e ajuda prestada.

À Dra Eridan de Medeiros Coutinho responsável por todas as minhas conquistas, eternamente agradeço sua presença em minha vida pelo exemplo de ser humano, pesquisadora, mãe e amiga.

Ao Curso de pós- graduação em Patologia, com um agradecimento especial aos funcionários Rosangela da Cruz Paixão e Tauar Sampaio de Figueiredo.

Aos Diretores Rômulo Maciel do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a Mitermayer Galvão dos Reis do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, por todo apoio institucional.

Ao Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas pela contribuição e ensinamentos necessários a realização deste trabalho.

Ao Dr Alberto A. N. Dutra pelas contribuições indispensáveis e amizade.

À Bruno Solano Freitas Souza, Elton P. de Sá Barreto Jr. e Ramon Campos Nascimento pela ajuda prestada, pelas palavras de conforto, pelos estímulos e exemplos e, acima de tudo, pela paciência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, pelos anos de convívio que foram transformados em amizade para toda vida.

À Flavia Góes Calmon Maciel pela amizade, apoio e colaboração indispensáveis a realização deste trabalho.

Às amigas Carine Machado Azevedo, Carla Adriana G. Ferreira, Elisalva Texeira Guimarães e Siane Campos de Souza e Juliana Fraga V. Senra por todo apoio científico e pessoal em momentos cruciais deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Imunopatologia do CPqAM pelas amizade e apoio prestados.

Aos amigos Cláudio Roberto da S. Costa, Fabrício Souza e Silva, Matheus Santos de Sá e Ricardo Santana Lima pelos conhecimentos transmitidos e pelo carinho durante todo o nosso convívio.

À Antonio Carlos da Silva Santos, Alena Pexoto Medrado, Claudia M. da Cunha Borges pelo precioso convívio e amizade. Agradeço a contribuição indispensável à realização deste trabalho.



À Eunice Ribeiro Motta pela preparação das lâminas histológicas.

As pesquisadoras e amigas Cristiane Flora Villa Real, Fabiana Regina Nonato, Mara Dias Pires e Simone Santos Macambira por toda ajuda dispensada.

À Denis Zubieta pela ajuda prestada na montagem das imagens.

À Lucyvera Imbroinisi e Roberta Couto pelo apoio e ajuda prestados.

Ao Biotério do CPqGM, pela atenção e colaboração prestados. Um agradecimento especial aos meus amigos: Adriana da Silva Mendes, Márcio Ferreira dos Santos, Josilene de Jesus Souza, Fabienne Petitinga Paiva e Vitor Valério Maffili.

Às bibliotecárias Advane de Araújo, Ana M. Fiscina Vaz Sampaio e Marta M. Martinez e do CPqGM pela amizade e orientação.

À todos os amigos do CPqGM que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse experimento e que não foram aqui citados, meu sinceros agradecimentos.

**SUMÁRIO**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

***1 INTRODUÇÃO*** **13**

---

1.1	FIBROGÊNESE HEPÁTICA	14
1.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS HEPÁTICAS	16
1.3	TERAPIA CELULAR	22
1.4	CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS	23
1.5	MECANISMOS DE ATUAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO EM LESÕES HEPÁTICAS	25
1.6	CÉLULA-TRONCO HEPÁTICA	27
1.7	DOENÇAS HEPÁTICAS INDICATIVAS PARA TERAPIA CELULAR	28

***2 OBJETIVOS*** **30**

---

2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	MANUSCRITO I	30
2.2.1	ESPECÍFICOS	30
2.3	MANUSCRITO II	31
2.3.1	ESPECÍFICOS	31
2.4	MANUSCRITO II	32
2.4.1	ESPECÍFICOS	32

***3. MANUSCRITO I*** **33**

---

***4. MANUSCRITO II*** **58**

---

***5. MANUSCRITO III*** **89**

---

<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>118</b>
<hr/>	
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>130</b>
<hr/>	
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>131</b>
<hr/>	
<b>9. ANEXO I</b>	<b>144</b>
Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, Braga EL, de Carvalho WA, Genser B, dos Santos RR, Lyra LG. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. <b>World J Gastroenterol.</b> 2007 13(7):1067-73.	
<hr/>	
<b>10. ANEXO II</b>	<b>152</b>
Soares MB, Oliveira SA, Souza BSF, Freitas LAR, Lyra AC, Lyra LG, dos Santos RR. <b>Terapias Celulares em Hepatopatias.</b> Em <i>Terapias Avançadas - Células-tronco, Terapia Gênica e Nanotecnologia Aplicada à Saúde.</i> Ed. Atheneu, São Paulo, p.91-101, 2007.	
<hr/>	

## RESUMO

**Estudo do potencial terapêutico de células mononucleares de medula óssea em lesões hepáticas crônicas em camundongos.** SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças hepáticas vem sendo investigado. Estudos em modelos animais têm servido de base para a realização de ensaios clínicos utilizando células de medula óssea. Embora os resultados iniciais venham sendo bastante promissores, os mecanismos envolvidos na melhora hepática ainda não estão claros e novas avaliações em modelos experimentais se fazem necessárias. O objetivo da presente investigação foi avaliar a eficácia terapêutica de células mononucleares de medula óssea em doenças hepáticas crônicas. Inicialmente estabeleceu-se cirrose hepática no camundongo C57Bl/6, pela administração de uma solução de 20% de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) diluído em azeite de oliva combinado com 5% de etanol (EtOH) na água. Neste estudo observamos que, após seis meses de administração dos agentes hepatotóxicos, ocorre o desenvolvimento de lesões crônicas características de cirrose hepática. O segundo modelo utilizado foi o da infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni*. Uma vez estabelecidas as lesões hepáticas crônicas nos animais, os estímulos "lesivos foram retirados e células mononucleares de medula óssea ( $3 \times 10^7$ ) obtidas de tíbia e fêmures de camundongos transgênicos para proteína fluorescente verde (GFP) foram infundidas. A avaliação da capacidade migratória das células infundidas, bem como das alterações ocorridas após a terapia celular foi avaliada por meio de métodos histológicos, de imunofluorescência, morfológicos e imunológicos no tecido hepático. Após a terapia celular, observamos, nos dois modelos de fibrose hepática analisados, que as células GFP<sup>+</sup> infundidas foram capazes de migrar e permanecer nas áreas de lesão do fígado. Inicialmente estas células apresentam formas arredondadas sem adentrar o tecido fibroso. Posteriormente, estas células tendem a invadir o tecido fibroso e assumem formas fusiformes. Uma redução do tecido fibroso foi verificada no 2º mês pós-terapia, em todos os grupos que receberam a terapia celular tanto nas áreas de fibrose septal e portal, quanto nas áreas dos granulomas. Os níveis de TGF-β no tecido hepático estavam diminuídos, após a terapia celular. O número de células ovais, conhecidas como células-tronco do fígado, estava aumentado no parênquima hepático após terapia celular. Os animais esquistossomóticos tratados com células de medula óssea recuperaram parcialmente a produção de albumina, quando comparado aos animais infectados. As observações sobre a terapia celular nos dois modelos de lesão crônica dos fígados avaliados nos permitem concluir que o transplante de células mononucleares de medula óssea diminui as alterações teciduais decorrentes de agressões crônicas ao fígado e reforçam a utilização deste tratamento para pacientes portadores de lesões hepáticas crônicas.

[PALAVRAS- CHAVE] terapia celular – fibrogênese hepática – tetracloreto de carbono – *Schistosoma mansoni* - camundongos

## ABSTRACT

**Study of the therapeutic potential of bone marrow mononuclear cells in chronic hepatic lesions in mice.** SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA. The therapeutic potential of stem cells on chronic liver diseases has been widely investigated. Based on results obtained mainly in studies using experimental models of acute liver injury, phase I clinical trials have already been carried out in patients with chronic liver diseases using therapy with bone marrow cells. Although the initial results were promising, the mechanisms involved on improvement of hepatic function are not clear and new evaluations with experimental models akin to human chronic liver diseases are needed. The object of the present investigation was the evaluation of the therapeutic efficacy of bone marrow mononuclear cells in chronic hepatic disease models. Initially, a mouse model of hepatic cirrhosis was induced in C57Bl/6 mice by administration of 20% carbon tetrachloride solution (CCl<sub>4</sub>) diluted in olive oil combined with 5% ethanol (EtOH) in water was established. In this study we observed the development of chronic lesions characteristic of cirrhosis after at least 6 months of administration of the hepatotoxic agents. The second model used was hepatic fibrosis caused by chronic infection by *Schistosoma mansoni*. Once the chronic lesions were established, the lesion stimulus was suspended and bone marrow mononuclear cells ( $3 \times 10^7$ ) obtained from tibiae and femurs of green fluorescence protein (GFP) transgenic mice were administered. The migratory capacity of the administered cells, as well as the alterations occurring after the cell therapy, was evaluated by histological, immunofluorescence, morphological and immunological methods in the liver tissue. After cell therapy in both hepatic fibrosis models it was observed that administered GFP<sup>+</sup> cells were able to migrate and remain on hepatic lesion areas. Initially those cells presented an oval shape outside the fibrous tissue. At latter timepoints, those cells invaded the fibrous tissue and acquired a fusiform shape. A reduction of fibrosis was verified after the second month of therapy in all groups that received the cell therapy in the granuloma areas, as well as in areas of septal and frontal fibrosis. The levels of TGF- $\beta$  were lower after the cell therapy, with statistical significance only in schistossomotic animals. The number of oval cells, known as liver stem cells, was increased in hepatic parenchyma after cell therapy. The schistossomotic animals treated with bone marrow cells recovered partially the production of albumin when compared to infected controls. Based on our observations about cell therapy in both models of chronic liver diseases evaluated we conclude that bone marrow mononuclear cell transplantation decreases tissue alterations caused by chronic aggressions to the liver and reinforce the use of this therapy in patients with chronic liver lesions.

[KEY WORDS] Cellular therapy – hepatic fibrogenesis – carbon tetrachloride – schistosomiasis - mice

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ -SMA	_____	Alfa-actina de músculo liso
CCl <sub>4</sub>	_____	Tetracloroeto de carbono
CCl <sub>3</sub>	_____	Triclorometil
EGF	_____	Fator de crescimento epidérmico
EtOH	_____	Ethanol
Fah <sup>-/-</sup>	_____	Camundongo deficiente para enzima fumarilacetoacetato hidrolase
HP	_____	Hepatectomia parcial
IL-6	_____	Interleucina-6
MEC	_____	Matriz extracelular
MMP	_____	Metaloproteinase de matriz
PDGF	_____	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PUFA	_____	Lipídio polinsaturado
TGF- $\beta$	_____	Fator de crescimento tumoral- $\beta$
TNF- $\alpha$	_____	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
TIMP	_____	Inibidor de metaloproteinase tecidual

## 1 INTRODUÇÃO

---

As doenças hepáticas representam um grave problema de saúde pública, comprometendo não só o bem estar social do indivíduo como também a economia do país. Oriundas de diferentes etiologias, as doenças crônicas do fígado têm gerado uma curva ascendente de morbidade, sendo responsáveis por um considerável número de atendimentos e internações hospitalares com um índice crescente de risco de morte. Dentre as causas mais comuns das doenças do fígado estão o consumo excessivo de álcool e as hepatites virais, principalmente pela infecção pelos vírus B e C (CORRAO & ARICO, 1998; KEEFFE, 2001; TSUI *et al.*, 2006).

Os tratamentos existentes para as hepatopatias são limitados e diferenciados, a depender da etiologia e/ ou persistência do estímulo. Em geral as terapias atuais tentam deter ou atrasar a agressão tecidual, conseguindo apenas minimizar os danos nas células para reduzir as complicações associadas à doença. Quando as medidas terapêuticas não são eficientes, os pacientes podem evoluir para cirrose (SCHALM, 1997). O transplante de fígado passa a ser o tratamento mais eficaz disponível para os pacientes com insuficiência hepática crônica (IREDALE *et al.*, 2003). Embora o fígado seja um órgão de baixa rejeição imunológica, todo transplante de órgão é um procedimento de risco que acarreta o uso de drogas imunossupressoras para o resto da vida. Além disto, outros fatores, tais como a limitada disponibilidade de órgãos e a existência de co-morbidades, tais como doenças cardíacas ou pulmonares (HEIDELBAUGH & SHERBONDY, 2006; LAKE, 2001) podem contra-indicar o transplante, justificando a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar a função do fígado nos pacientes com insuficiência hepática crônica.

A descoberta da plasticidade das células-tronco de medula óssea tem aberto novas perspectivas de tratamento para pacientes com doenças crônico-degenerativas. O potencial de auto-renovação destas células e a sua habilidade de originar linhagens celulares (KÖRBLING *et al.*, 2003) têm servido de base para o estabelecimento de uma nova área de pesquisa, a medicina regenerativa. De um modo geral, a medicina regenerativa busca um caminho alternativo onde um órgão lesado possa ser regenerado através da substituição de células perdidas, resultando em uma melhora tecidual com conseqüente restauração de suas funções (MIMEAULT *et al.*, 2007).

Ensaio clínico com terapia celular em hepatopatias crônicas vêm sendo realizados com base nos resultados obtidos nos trabalhos pré-clínicos, mostrando a importância dos estudos experimentais na medicina. Grande parte do entendimento dos mecanismos envolvidos nas doenças e, conseqüentemente, o estabelecimento de novas terapias têm sido obtidos através dos estudos em modelos experimentais, principalmente em ratos e camundongos. Neste contexto, um bom modelo experimental deve mimetizar a patologia da forma mais próxima da que ocorre em seres humanos, para que se possa estabelecer novos meios de intervenções terapêuticas mais eficazes e seguras.

## 1.1 FIBROGÊNESE HEPÁTICA

Lesões hepáticas persistentes ou necroses hepatocelulares repetidas oriundas de diferentes causas resultam em um processo de reparo que tenta restabelecer o funcionamento normal do fígado. Quando o fígado sofre algum dano, células inflamatórias e residentes, a exemplo das células de Kupffer, são recrutadas e passam a liberar citocinas, tais como Fator de Crescimento Tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), e outros agentes quimiotáticos que regulam em conjunto a resposta inflamatória e estimulam a



fibrogênese (PINZANI *et al.*, 1989; GRESSNER *et al.*, 2002). Esta se deve, principalmente, à ativação e alteração fenotípica das células estreladas que, em estado normal, encontram-se quiescentes no espaço perisinusoidal de Disse (GEERTS, 2001). Uma vez estimuladas, as células estreladas liberam seus depósitos de vitamina A e adotam um fenótipo de células semelhantes a miofibroblastos (FRIEDMAN *et al.*, 1985; MARRA, 1999), passando a expressar filamentos intermediários de colágeno e  $\alpha$ -SMA e a secretar componentes da MEC (FRIEDMAN *et al.*, 1985). A diferenciação e a proliferação das células estreladas requerem um estímulo fibrogênico persistente do TGF- $\beta$  e do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) (YANG *et al.*, 2003) (Fig 1). Desde a década de 1970, estudos experimentais estabeleceram que a fibrose hepática é resultante não apenas da síntese, mas também do padrão de degradação da MEC (OKAZAKI & MARUYAMA, 1974). No fígado, a estabilidade dos componentes da MEC é regulada pelas metaloproteinases (MMP) e por seus inibidores específicos (TIMPs) (HEMMANN *et al.*, 2007). Quando ocorre dano ao tecido, o equilíbrio funcional é prejudicado e há alterações nos processos de fibrogênese e de fibrólise, resultando em uma exacerbação do tecido fibroso (HEMMANN *et al.*, 2007). Em lesões crônicas avançadas, o fígado contém aproximadamente seis vezes mais componentes da MEC do que o parênquima normal, incluindo os colágenos (I, III e IV), a fibronectina, a elastina, o ácido hialurônico e os proteoglicanos (ROJKIND *et al.*, 1979; ARTHUR, 1998). O processo de fibrose hepática é essencial ao reparo, pois, em muitos casos, passa a dar sustentação às estruturas vasculares e também as ductais ou ductulares, causando alterações funcionais importantes. Se os depósitos de fibrose forem recentes, poderá ocorrer reabsorção; todavia, em processos mais antigos, há uma resistência à degradação pelas metaloproteinases devido ao aparecimento de reticulações, os chamados “cross-linkings”, entre as moléculas que formam as fibras colágenas (EYRE *et*

*al.*, 1984). O desenvolvimento contínuo desse processo fibroso difuso no parênquima hepático, com formação de nódulos regenerativos em resposta à necrose hepatocelular, juntamente com as alterações secundárias do sistema vascular, levam ao desenvolvimento da cirrose e, em alguns casos, à insuficiência hepática. No caso de insuficiência hepática descompensada transplante de fígado torna-se o recurso terapêutico mais eficaz para pacientes com doença hepática terminal (IREDALE *et al.*, 2003).

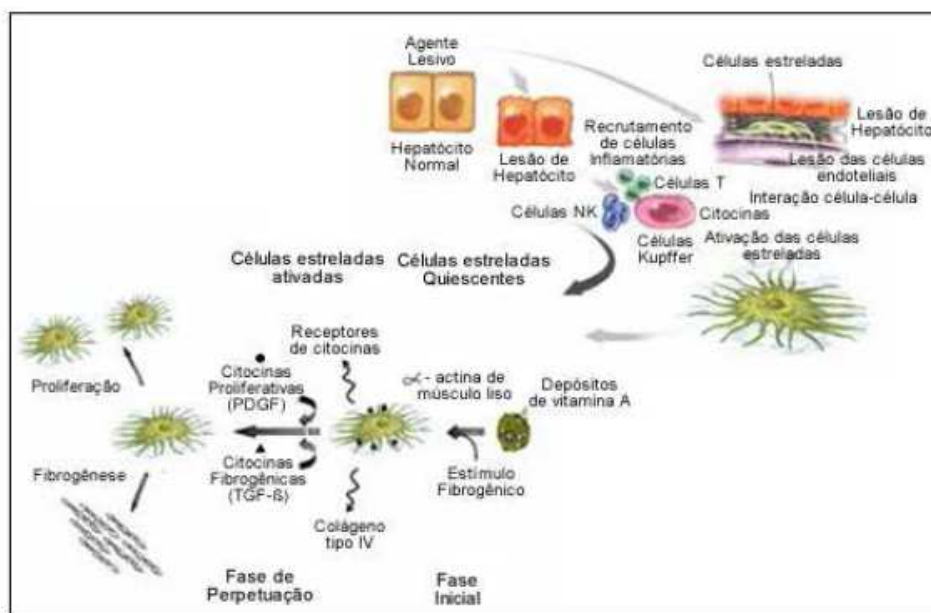


Fig 1. **Fibrogênese hepática.** Alterações na resposta celular e na composição da matriz extracelular Figuras modificadas do Hepatology 43: S113-S120, 2006 e do Indian J Pediat, 74: 393-399, 2007.

## 1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOENÇAS HEPÁTICAS

O desenvolvimento da fibrose ou cirrose hepática está associado ao aumento de morbidade e mortalidade (KEEFFE *et al.*, 2001). Na tentativa de elucidar ou minimizar os problemas gerados pela fibrose, estudos experimentais têm sido importantes

ferramentas para a descoberta de mecanismos celulares efetores da fibrogênese hepática, bem como das alterações sofridas pela MEC. Todavia, os mecanismos patogênicos da cirrose ainda não estão totalmente esclarecidos, e, portanto novos estudos ainda são necessários principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

As doenças hepáticas servem, genericamente, como modelo de estudo do processo de fibrogênese (IREDALE, 2007). Alguns protocolos experimentais têm sido sugeridos para a realização destes estudos, os quais incluem cultura de células (FRIEDMAN *et al.*, 1985; 1992), explantes e biópsias (TSUKAMOTO *et al.*, 1990), e modelos animais (WANLESS *et al.*, 2000). De uma forma geral, estes estudos apresentam vantagens e desvantagens: As culturas celulares facilitam os estudos dos mediadores fibrogênicos, mas elas não reproduzem o evento que ocorre *in vivo*; considerações éticas não permitem a realização de biópsias sucessivas nos pacientes, e, muitas vezes, as amostras obtidas tendem a ser representativas apenas do estágio avançado da doença; por fim, os modelos experimentais mimetizam muitas das patologias humanas e podem apresentar alterações nos mecanismos envolvidos nas lesões em comparação com seres humanos (IREDALE, 2007).

Diversos são os modelos que possibilitam a realização de estudos da regeneração hepática em camundongos e ratos. Dentre os cirúrgicos, o mais empregado até hoje se baseia no trabalho de Higgins e Anderson (1931), que realizaram ressecção dos lobos anteriores de aproximadamente 67% da massa total do fígado de ratos Wistar. Após a hepatectomia parcial (HP), os lobos residuais crescem rapidamente até que o volume do órgão se aproxime do tamanho normal no período de 14 a 21 dias. Outro modelo cirúrgico utilizado é o da ligadura de ramo portal que, de modo semelhante ao que acontece na HP, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a

interleucina-6 (IL-6) (CRESSMAN *et al.*, 1996; STARKEL *et al.*, 1999) e o TNF- $\alpha$  (BRAUN *et al.*, 1988).

Dentre os modelos farmacológicos, o mais utilizado para estudos da fase aguda de lesões do fígado é o causado pela administração do paracetamol, que é hoje responsável um grande número de casos de hepatites fulminantes, principalmente no Reino Unido onde o índice atinge cerca de 40% dos casos. Esta incidência alta decorre de erros posológicos ou de tentativas de suicídio pelo uso do medicamento (OSTAPOWICZ *et al.*, 2002). A administração do paracetamol pode causar, em camundongos, hepatite fulminante com necrose centrolobular característica e alto índice de mortalidade devido à baixa de concentrações celulares de glutatona (MITCHELL *et al.*, 1973; THOMAS *et al.*, 1993). Na fase crônica, o modelo farmacológico mais amplamente utilizado é o de lesão por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) que, associado ou não ao consumo do álcool, lesa o fígado através da formação de radicais livres durante a sua metabolização (triclorometil – CCl<sub>3</sub>; triclorometilperoxil- OOCCL<sub>3</sub>) (BOSMA *et al.*, 1988). Em peroxidação lipídica um radical livre primário R<sup>\*</sup> interage com lipídio polinsaturado (PUFA) para iniciar uma reação em cadeia. Nesta reação o lipídio insaturado após perder um hidrogênio na ligação dupla adiciona uma molécula de O<sub>2</sub> formando um radical livre no oxigênio adicionado, este radical inicia a reação em cadeia retirando hidrogênio de duplas ligações de outros lipídios insaturados na vizinhança. Os produtos finais desta peroxidação de lipídios são aldeídos altamente reativos e alguns como 4-hidroxinonal que são quimiotáticos recrutando células inflamatórias para a área (Fig. 3) (SLATER, 1984).

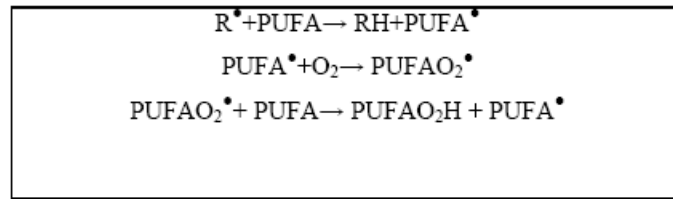


Fig 3. Esquema modificado Biochem. J. 222, 1-5, 1984

A peroxidação dos lipídios promove rápida desintegração da estrutura e da função do retículo endoplasmático rugoso. Em menos de 30 minutos ocorre um declínio da síntese hepática de proteínas, seguido do edema do retículo endoplasmático agranular e da liberação dos ribossomos de superfície do retículo granular. Ocorrendo redução do transporte de lipídios de hepatócitos devido a sua incapacidade de sintetizar apoproteína para se ligar aos triglicéridios e facilitar a secreção de lipoproteínas. O resultado deste processo é a esteatose hepática (RECKNAGEL, 1967; SLATER, 1984).

Paralelamente a estes eventos, ocorre a lesão de mitocôndria, seguida de edema progressivo das células devido ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, com influxo de cálcio e morte celular (RECKNAGEL, 1967; SLATER, 1984). A administração à longo prazo de  $\text{CCl}_4$  em ratos produz o quadro histopatológico característico da cirrose hepática e da hipertensão portal verificado em seres humanos (TAMAYO, 1983). Tamayo (1983) sumariza, em sua revisão, que o modelo experimental de  $\text{CCl}_4$  tem ajudado a elucidar muitos componentes envolvidos na patogênese da fibrose experimental e, conseqüentemente, da cirrose humana. Dentre os conhecimentos adquiridos, os principais são: 1) a origem do estímulo fibrogênico e a sua relação com a necrose celular hepática; 2) os tipos celulares envolvidos na produção de colágeno no fígado; 3) a presença em diferentes proporções dos vários tipos de colágenos e 4) a distribuição dos diferentes tipos de colágenos.

Animais transgênicos constituem uma importante ferramenta que vem sendo empregada em estudos experimentais. Um modelo experimental que vem sendo bastante utilizado nos estudos de hepatopatias é o do camundongo deficiente para a enzima Fumarilacetoacetato hidrolase (Fah<sup>-/-</sup>). Este modelo mimetiza a tirosinemia tipo 1 que ocorre em seres humanos (GROMPE *et al.*, 1993). Nos camundongos Fah<sup>-/-</sup>, há uma alteração metabólica na qual o catabolismo da tirosina é interrompido pela deficiência desta enzima, normalmente presente no fígado e rins. O acúmulo de metabólitos tóxicos causa lesões hepáticas. O quadro clínico envolve hiperbilirrubinemia, hipoproteïnemia, hipoglicemia e defeitos na coagulação. O tratamento disponível envolve a restrição alimentar de tirosina, além da utilização de drogas específicas que previnem a formação de metabólitos tóxicos. Todavia, a cura da tirosinemia tipo 1 só é possível através do transplante hepático (NAKAMURA *et al.*, 2007).

Outros modelos utilizados na fibrogênese hepática são os parasitários, causados pela *Capilaria hepática* e pelo *Schistosoma mansoni*. Durante o seu ciclo vital, as larvas da *C. hepática* se tornam vermes no interior do fígado do hospedeiro e aí depositam os seus ovos, vindo a morrer algum tempo depois. Nos ratos, todos os vermes já estão mortos ao fim do primeiro mês de infecção. A fibrose septal se inicia um pouco antes e se acentua no mês seguinte, mantendo-se aparentemente estável até o quarto mês. Mas, a partir daí a fibrose começa a regredir, ficando cada vez mais fina, fragmentada e ondulada, porém sem desaparecer por completo. Ratos infectados com *C. hepática* desenvolvem invariavelmente uma fibrose hepática septal fina e difusa após 30 dias de infecção (FERREIRA & ANDRADE, 1993). Todavia, a fibrose septal se forma no rato infectado por *C. hepática*, mas não no camundongo, que desenvolve inicialmente uma intensa hepatite aguda, difusa e focal, mas logo estas lesões são moduladas,

desaparecendo a hepatite reacional difusa e persistindo as lesões em torno de ovos e restos de vermes (GOTARDO *et al.*, 2003).

Na esquistossomose humana, as infecções crônicas podem levar ao desenvolvimento da forma grave, caracterizada por esplenomegalia e hepatomegalia, na qual o fígado apresenta fibrose estrelada difusa do espaço porta visível macroscopicamente, com presença de infiltrados inflamatórios periportais variáveis, de acordo com o espaço porta que contém ovos e granulomas ou tecido de reparo (BOGLIOLO, 1957; DE WITT & WARREN, 1959).

Embora a patogenia da fibrose periportal pareça simples, ela é bastante complexa, pois ainda não se sabe exatamente por que menos de 10% de uma população de área endêmica desenvolvem a forma grave da doença. Sabe-se que apenas indivíduos com elevada carga parasitária apresentam a forma grave da doença (CHEEVER, 1965). Contudo, já foi observado que nem todos os indivíduos com alto número de ovos por grama de fezes apresentam este quadro (COURA & CONCEIÇÃO, 1981).

Vários fatores vêm sendo estudados e apontados como coadjuvantes no desenvolvimento da forma hepatoesplênica da esquistossomose. Dentre eles incluem-se o tempo de infecção, ocorrência de reinfecções, defeitos afetando o mecanismo de modulação imunológica dos granulomas periovulares, carga parasitária, ajuste hepático vascular, fatores nutricionais e fatores associados à biologia da matriz extracelular do fígado, todos parecem ter participação importante na formação da lesão em estudo (ANDRADE, 1998). Ainda não é bem conhecido como estes fatores podem influenciar no desenvolvimento da forma grave em humanos, e por isso a patogenia da fibrose periportal esquistossomótica ainda não está esclarecida.

O modelo em camundongos se torna adequado ao estudo porque animais infectados com carga parasitária reduzida após 16 semanas de exposição desenvolvem

os dois quadros anatomo-patológicos da doença correspondentes às formas hepatointestinal com presença de granulomas isolados e hepatoesplênica da doença com presença de fibrose periportal, semelhante à fibrose “pipestem” encontrada em seres humanos (ANDRADE, 1987; ANDRADE & CHEEVER, 1993). Embora já se tenha o conhecimento de muitas etapas da fibrogênese hepática, incluindo a complexa cascata de regeneração e a produção de fatores de crescimento e de citocinas, muitas perguntas ainda não foram respondidas. Entender melhor os mecanismos envolvidos na regeneração hepática seja ela decorrente de lesões agudas que resultem em agressão fulminante ou por agressão crônica, têm aplicações óbvias no desenvolvimento de novas terapias antifibrosantes.

### **1.3 TERAPIA CELULAR**

A medicina regenerativa é uma atividade que aplica os princípios da engenharia e das ciências da saúde para obtenção de substitutos biológicos que mantenham, melhorem ou restaurem as funções dos órgãos e tecidos do corpo humano (ANVISA, 2007). Desta forma, a medicina regenerativa tem, como principal objetivo, o direcionamento e a ampliação do processo de reparo, no sentido de substituir os tecidos lesados por tecidos mais próximos aos normais.

Neste contexto, surgem as células-tronco que são células indiferenciadas, capazes de proliferar e gerar um grupo de células idênticas às células progenitoras, como também gerar células funcionalmente diferenciadas que têm a habilidade de regenerar tecidos após uma lesão (POTTEN & LOEFFLER, 1990).

A plasticidade das células-tronco está classificada de acordo com o tipo celular que esta pode originar. A célula-tronco totipotente é o óvulo fertilizado ou zigoto, que é capaz de produzir todos os tipos de células encontrados no corpo, além das células que



suportam o desenvolvimento do embrião no útero (ZAGO, 2006). Estas células são encontradas apenas nas primeiras fases de divisão embrionária, quando o embrião tem três a quatro dias de vida (ZAGO, 2006). As células-tronco pluripotentes diferenciam-se apenas nos tipos celulares encontrados no embrião, surgem quando o embrião atinge a fase de blastocisto a partir do 5º dia de vida (ZAGO, 2006). Além dos embriões, os fetos constituem uma fonte de obtenção de células-tronco pluripotentes, da qual é possível obter linhagens de células-tronco germinativas a partir da crista gonadal (ZAGO, 2006). A utilização de células-tronco fetais ou embrionárias levanta uma série de questões éticas e religiosas, e por isso têm sido estudadas principalmente as células-tronco encontradas nos tecidos adultos ou no sangue de cordão umbilical. Dentre as fontes de obtenção das células-tronco adultas, a medula óssea apresenta uma grande vantagem por poder fornecer células para utilização autóloga, o que elimina as questões ético-legais e de rejeição. As células-tronco de medula óssea, em estudos experimentais, apresentaram uma grande plasticidade, tendo sido utilizadas em terapias celulares para vários tipos de agressões teciduais, tais como as lesões do coração (ASSMUS *et al.*, 2002) e do fígado (TERAI *et al.*, 2006).

#### 1.4 CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS

Nos últimos anos diferentes estudos têm avaliado o potencial de ação das células-tronco frente a lesões hepáticas. Lagasse e colaboradores (2000) observaram que a injeção intravenosa de células de medula óssea em camundongos deficientes para a enzima fumarilacetoacetato hidrolase ( $Fah^{-/-}$ ) restaura os nódulos hepáticos, que se tornam positivos para a enzima  $Fah^{+/+}$  e passam a apresentar padrão morfológico normal. O potencial regenerativo do tecido hepático pelas células-tronco de medula

óssea também foi demonstrado em animais lesados pelo CCl<sub>4</sub> e submetidos à infusão celular (FANG *et al.*, 2004; YANNAKI *et al.*, 2005).

A terapia celular causou melhora das funções bioquímicas nos animais Fah<sup>-/-</sup>, que passam a apresentar níveis normais de transaminases e de bilirrubinas (LAGASSE *et al.*, 2000; VASSILOPOULOS *et al.*, 2003). Camundongos tratados com CCl<sub>4</sub> apresentam normalização do tempo de protrombina (JANG *et al.*, 2004) e dos níveis séricos de albumina após terapia com células-tronco (OYAGI *et al.*, 2006).

A melhora bioquímica vem acompanhada da diminuição do percentual de tecido fibroso após a infusão celular em modelos de fibrogênese hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub> (FANG *et al.*, 2004, SAKAIDA *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2005) e pela dimetilnitrosamina (ZHAO *et al.*, 2005).

Na fibrogênese hepática, uma das principais citocinas envolvidas na regulação da formação e degradação de matriz extracelular e, portanto, dos processos fibróticos, é o TGF- $\beta$  (PINZANI *et al.*, 1989). Em modelos experimentais de agressão tecidual hepática, os níveis destas citocinas encontram-se diminuídos após a terapia celular (FANG *et al.*, 2004). Concomitante a esses achados, os níveis das metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação do colágeno, apresentam-se bem elevados após a administração das células-tronco (PISCAGLIA *et al.*, 2005; SAKAIDA *et al.*, 2005).

A morte celular nos tecidos hepáticos é diminuída após a terapia celular em modelos de hepatopatias experimentais, com diminuição das áreas inflamatórias (TANG *et al.*, 2003) e do número de células apoptóticas (CAPLAN *et al.*, 2006).

De um modo geral, a terapia celular tem melhorado as condições hepáticas nos vários modelos estudados. Isto é bem evidente na avaliação clínica dos animais, que apresentam ganho de peso (ZHAO *et al.*, 2005) e aumento da sobrevivência dos animais,

quando comparados aos grupos controles (DI CAMPLI *et al.*, 2004; SAKAIDA *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2005).

### 1.5 MECANISMOS DE ATUAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO EM LESÕES HEPÁTICAS

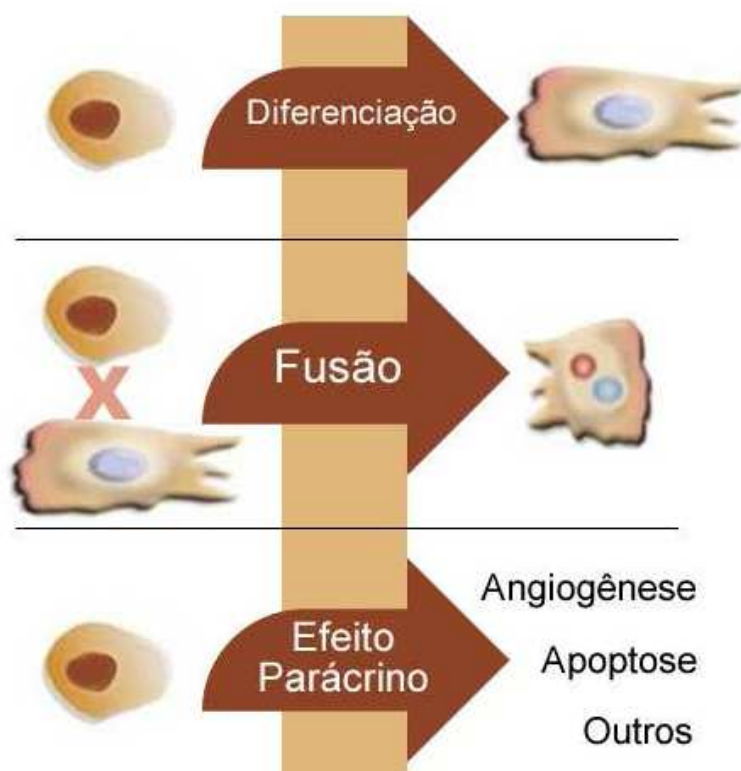
Resultados de estudos experimentais sugerem que as células-tronco de medula óssea transplantadas podem gerar outros tipos celulares em diversos tipos de tecidos após a lesão. Isto pode ser decorrente de um processo de diferenciação destas células em células residentes ou de fusão das células dos doadores com as células do receptor.

No fígado, estudos utilizando terapia com células-tronco de doadores Fah<sup>+/+</sup> em camundongos receptores Fah<sup>-/-</sup>, de sexo oposto ao do doador, demonstraram que o transplante celular preveniu a morte dos animais através da restauração das funções hepáticas. Os autores descrevem que o mecanismo responsável pela regeneração dos nódulos é a fusão celular, verificada através da análise dos cromossomos XY, onde cerca de 60% da repopulação nodular é de células dos doadores (LAGASSE *et al.*, 2000; VASSILOPOULOS *et al.*, 2003 e WANG *et al.*, 2003).

Novos estudos com modelo experimental de lesão hepática pelo CCl<sub>4</sub> demonstraram que as células-tronco provenientes da medula óssea são capazes de se diferenciar em hepatócitos, tanto *in vivo* como em estudos *in vitro*, sugerindo, portanto, que o mecanismo envolvido neste modelo é o da diferenciação celular (JANG *et al.*, 2004; SAKAIDA *et al.*, 2004).

Um terceiro mecanismo tem sido proposto, que é o da ação parácrina das células-tronco. Estas podem estar estimulando fatores quimiotáticos requeridos no processo de reparo, como os fatores de proliferação e de diferenciação celular que podem garantir a geração de novas células com restabelecimento de função dos tecidos

e conseqüentemente dos órgãos. Um exemplo desse processo já foi verificado por Higashiyama e colaboradores (2007) os quais observaram que células derivadas da medula óssea são capazes de estimular a síntese de metaloproteinases contribuindo assim para a regressão da fibrose. Em resumo, os mecanismos envolvidos na geração de novos hepatócitos ainda não são claros, e é possível que mais de um destes mecanismos estejam atuando na melhora tecidual. Contudo, estudos mais acurados se fazem necessários para o entendimento destes mecanismos (Fig.2).



**Fig 2** Possíveis mecanismos de ação das células-tronco em lesões hepáticas

## 1.6 CÉLULA-TRONCO HEPÁTICA

A capacidade de regeneração hepática frente a lesões do fígado é muito grande (MICHALOPOULOS, 1990). É sabido que mecanismos internos do organismo regulam o equilíbrio entre a velocidade de proliferação e a morte celular, de forma a manter o órgão com seu tamanho padrão e suas funções normais (MICHALOPOULOS, 1990). Estudos experimentais em ratos têm demonstrado uma evidência direta na manutenção da relação estroma/parênquima existente na proliferação de hepatócitos, que são capazes de se dividir para produzir células-filhas do mesmo tipo (MICHALOPOULOS, 1990). Através de hepatectomia parcial (MICHALOPOULOS, 1990) ou de agressão tecidual por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (WATANABE *et al.*, 1984), é possível demonstrar a grande quantidade de divisões celulares que ocorrem entre os hepatócitos sobreviventes na tentativa de recuperar o tecido perdido. O processo de diferenciação das células compreende diversas etapas programadas geneticamente (SCOTT, 1997). Dentre elas, destacam-se a ativação e/ou repressão de inúmeros genes, a expressão de citocinas que medeiam funções biológicas específicas, a repressão progressiva da capacidade de responder a fatores mitogênicos e a proliferação de células progenitoras ou células-tronco, imortais e que respondem a estímulo mitogênico (SCOTT, 1997).

A existência de células-tronco endógenas no fígado, as chamadas células ovais, foram descritas primeiramente por Opie (1944), e desde então, a presença destas células tem sido relatada em modelos experimentais de hepatocarcinogênese. Nos últimos anos tem sido postulado o papel das células ovais na regeneração hepática. Estas células recebem este nome por serem células pequenas (aproximadamente 10 µm de tamanho), com citoplasma escasso e núcleo ovóide, que proliferam no fígado de um organismo adulto. Células ovais expressam marcadores tanto do epitélio biliar (TEE *et al.*, 1994) como de hepatócitos (EVARTS *et al.*, 1987). Embora a localização das células ovais

permaneça incerta, sugere-se a existência destas células progenitoras hepáticas no canal de Hering (PAKU *et al.*, 2001). Estas células parecem surgir apenas em situações muito específicas, como nos casos em que hepatócitos são maciçamente destruídos e/ou estão impedidos de se replicar, por exemplo, após necrose hepática induzida experimentalmente por CCl<sub>4</sub> (ALISON *et al.*, 1997).

Todavia, estudos em seres humanos e em modelos experimentais têm indicado que células ovais podem ser derivadas de precursores da medula óssea (PETERSEN *et al.*, 1999). Mesmo não estando de acordo com o local de origem das células ovais, é um consenso a participação importante dessas células na repopulação do fígado após lesões severas.

### **1.7 DOENÇAS HEPÁTICAS INDICATIVAS PARA TERAPIA CELULAR.**

A terapia com células-tronco é um caminho bastante promissor na medicina regenerativa. O principal objetivo dessa terapia é promover uma melhora nas condições de vida dos pacientes com hepatopatias graves.

As doenças graves do fígado podem ser resultantes de estímulos agudos ou crônicos. A falência hepática aguda é um evento raro que pode levar a hipertensão intracraniana com morte cerebral, sepse e falência múltipla dos órgãos. As hepatites fulminantes ocorrem principalmente por infecções virais do tipo A (TAYLOR *et al.*, 2006) e B (LEE, 2003) e por drogas, a exemplo do paracetamol (LARSON *et al.*, 2005), ou ainda por causas desconhecidas.

As doenças crônicas do fígado apresentam causas diversas e podem ser classificadas a partir de sua origem em doenças virais, como é o caso das hepatites virais B e C, em tóxicas, principalmente pelo uso incorreto de medicamentos e pela ingestão abusiva do álcool, em doenças metabólicas e auto-imunes (KEEFFE, 2001).

O fato é que estas doenças podem culminar com a insuficiência hepática, e a alternativa terapêutica mais eficaz passa a ser o transplante hepático. Este, por sua vez, apresenta algumas complicações, tais como o baixo número de órgãos disponíveis para o transplante, complicações nas técnicas cirúrgicas envolvendo estruturas vasculares e biliares e uso de imunossupressores para o resto da vida. Uma alternativa terapêutica que minimize os danos decorrentes de agentes lesivos ao fígado é necessária. Neste contexto, as células-tronco aparecem como importante ferramenta na medicina regenerativa.

## **2 OBJETIVOS**

---

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial terapêutico do transplante de células mononucleares de medula óssea em lesões hepáticas crônicas em modelos experimentais de cirrose induzida pela administração do tetracloreto de carbono e na fibrogênese hepática resultante da infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

### **2.2 MANUSCRITO I**

Caracterizar o modelo de cirrose hepática em camundongos C57Bl/6 através da administração do tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>).

#### **2.2.1 ESPECÍFICOS**

- Induzir lesão hepática em camundongos C57Bl/6 pela administração de CCl<sub>4</sub> associado ou não ao etanol;
- Observar a evolução da lesão hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub>;
- Avaliar as alterações morfológicas e morfométricas do fígado de animais tratados com CCl<sub>4</sub> ou CCl<sub>4</sub> + etanol;



## 2.3 MANUSCRITO II

Investigar o potencial terapêutico de células-tronco mononucleares de medula óssea em no modelo de cirrose induzida por CCl<sub>4</sub> em camundongos.

### 2.3.1 ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da terapia com uma ou três doses de células mononucleares de medula óssea nos camundongos previamente submetidos à lesão hepática crônica através de análises morfológicas e morfométricas;
- Verificar a capacidade de migração das células mononucleares de medula óssea para os sítios de lesão hepática e sua permanência no fígado;
- Avaliar a presença de células ovas no fígado de animais cirróticos tratados com células mononucleares de medula óssea;
- Mensurar os níveis da citocina fibrosante TGF- $\beta$  no fígado dos animais submetidos à terapia celular.

## 2.4 MANUSCRITO III

Investigar o potencial terapêutico do transplante de células mononucleares de medula óssea em lesões hepáticas resultantes da infecção crônica por *S. mansoni*.

### 2.4.1 ESPECÍFICOS

- Analisar a eficácia terapêutica das células mononucleares de medula óssea em camundongos C57Bl/6 com lesões crônicas pela infecção por *S. mansoni* através de avaliações morfológicas e morfométricas nas lesões hepáticas;
- Mensurar os níveis da citocina TGF- $\beta$  no fígado de animais submetidos à terapia celular;
- Quantificar o número de células ovais no fígado dos camundongos após a terapia celular;
- Avaliar a expressão de albumina no fígado dos animais infectados submetidos à terapia celular.

***3 MANUSCRITO I***

---

**Cirrhosis induction and progression to hepatocellular carcinoma in mice chronically treated with carbon tetrachloride**

Sheilla A. Oliveira<sup>a,b</sup>, Luiz A. R. de Freitas<sup>a</sup>, Alberto Augusto Noronha Dutra<sup>a,d</sup>,  
Bruno S. F. Souza<sup>a</sup>, Matheus S. Sa<sup>a</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>a,c</sup>, Milena B. P.  
Soares<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup> Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brazil

<sup>d</sup> University College Medical School of London, London, U.K.

**Correspondence:**

Milena B. P. Soares

Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, 121 - Candeal – Salvador, BA, Brazil-40296-750

Tel: +55 71 3176 2260

Fax: +55 71 3176 2272

E-mail: [milena@bahia.fiocruz.br](mailto:milena@bahia.fiocruz.br)

## **Abstract**

Hepatic cirrhosis is an end-stage change related to a variety of causes and results in profound modifications of hepatic structures, with severe functional and structural consequences, including development of hepatocellular carcinoma (HCC). Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is commonly used to induce liver damage and fibrosis deposition in many experimental studies in rats and mice, although in the latter morphological changes characteristic of cirrhosis are rarely described. Thus, the main purpose of this study was to characterize a model of liver fibrosis with morphological alterations characteristic of cirrhosis by CCl<sub>4</sub> administration in C57Bl/6 mice. Mice were treated with CCl<sub>4</sub> by gavage alone or in combination with 5% of ethanol (EtOH) in the drinking water. After 6 months of treatment, all animals developed cirrhosis characterized by hepatocytic nodules delimited by complete septal fibrosis containing a few inflammatory cells. Fibrosis deposition was increased by the administration of EtOH combined with CCl<sub>4</sub>. Proliferation of ductular cells, regenerative macronodules containing ballooning cells, steatosis and Mallory bodies were observed. There were dysplastic alterations of high grade in most animals after 8 months of treatment, and, in some, the development of invasive neoplasia with microscopic characteristics of HCC. Our results demonstrate that CCl<sub>4</sub> administration induces cirrhosis in mice with a spectrum of alterations similar to that observed in humans, including development of macronodules and HCC, and indicate this model for investigations of the pathogenesis of cirrhosis, especially to understand the factors leading to the development of HCC and for new therapeutic interventions.

**Keywords:** Hepatic cirrhosis; C57Bl/6 mice; Carbon tetrachloride; Hepatocellular carcinoma

## **Introduction**

Hepatic cirrhosis is an end-stage liver change related to a variety of causes that includes virus, chemical agents, autoimmunity, hereditary disease and biliary diseases. It results in profound hepatic morphological changes that may lead to severe functional alterations associated with hepatic failure and portal hypertension, and an increased rate of morbidity and mortality worldwide (Keefe 2001). Cirrhosis is also considered to be a major risk to hepatocellular carcinoma (HCC), as the majority of patients who development HCC have underlying chronic liver disease and established cirrhosis (Tiribelli *et al.* 1989; Kew & Popper 1984; Parkin *et al.* 2001).

Cirrhosis of virtually any cause may be followed by the development of HCC (Kumar *et al.* 2007). This process is preceded and accompanied by morphological lesions that are recognized as preneoplastic changes. Small cell dysplasia and high grade dysplastic nodules are considered as precursor lesions as they have been proven to give rise to HCC (Su *et al.* 1997; Borzio *et al.* 1998). Limited studies with human samples suggest that molecular changes, like loss of heterozygosity and chromosomal gains and losses, increase the potential evolution from these precursor lesions to HCC (Maggioni *et al.* 2000; Sun *et al.* 2001; Tornillo *et al.* 2002; Plentz *et al.* 2004). These studies with human tissue, however, are limited because they do not permit to follow sequentially the molecular and morphological changes (hepatocarcinogenesis) from its very beginning to the stages of advanced cancer in cirrhosis.

Therefore, the use of animal models is important to understand not only the pathogenesis of cirrhosis but also of HCC development and for the design of intervention strategies and drug development. Various experimental models of

chronic liver injury have been described. Among these models, the hepatic cirrhosis caused by repeated administration of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) associated or not with alcohols is widely used as a cirrhosis model (Tamayo 1983). Rats are more susceptible to cirrhosis induction by CCl<sub>4</sub> administration than mice (Nagano *et al.* 2007). Usually the appearance of complete septal fibrosis and regenerative nodules characteristics of cirrhosis are not seen in mice upon short-term administration of CCl<sub>4</sub>.

The use of a mouse model of well-established cirrhosis and HCC would facilitate the study of this pathological process due to the greater number of available tools for research using mouse models, such as transgenic and knockout animals, as well as a variety of products and reagents. In this report we describe a mouse model of hepatic cirrhosis with characteristics similar to the human disease by administration of CCl<sub>4</sub> in C57Bl/6 mice, a strain commonly used in transgenesis. Of most interest is the observation that many mice in this model developed a sequence of changes from macroregenerative nodules to dysplastic nodules, nodules in nodules, and HCC very akin to what have been described in human hepatic carcinogenesis (Libbrecht *et al.* 2005). Such a model can be used to elucidate many aspects of the pathogenesis of cirrhosis and HCC, as well as for the development of new effective therapies.

## **Methods**

### *Animals*

Three week-old female or male C57Bl/6 mice, weighting 20-23 g were maintained at the animal facility of Gonçalo Moniz Research Center/FIOCRUZ, in rooms with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ$  C) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) and continuous air

renovation. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle (6 am-6 pm) and provided with rodent diet and water ad libitum. All procedures described here had prior approval from the local animal ethics committee.

#### *Cirrhosis induction*

Groups of mice were treated with 0.2 ml of 20% CCl<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) in olive oil by oralgastric route twice a week, combined or not with 5% (v/v) ethanol in the drinking water. Normal control littermates were maintained in the same housing conditions. After different times of CCl<sub>4</sub> administration (1-4, 6 and 8 months), groups of 4-15 animals were sacrificed for histological and morphological evaluations.

#### *Morphological and morphometrical analyses*

Liver slices were fixed in Bouin or formalin at 10% and embedded in paraffin, and 5 µm-thick sections obtained were stained with haematoxylin-eosin or picrosirius-red method for collagen (Junqueira *et al.* 1979). For fibrosis quantification, 5 µm-thick liver histological sections sampled randomly and stained with picrosirius-red were examined by optical microscopy. Images were digitalized using a color digital video camera (CoolSnap, Montreal, Quebec, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The images were analyzed with the Image Pro program (version 5.0; Media Cybernetics, San Diego, CA.).

Cirrhosis was defined by the presence of parenchymatous nodules delimited by fibrosis occupying all or most of liver parenchyma. Nodules larger than 650 µm or presenting with alterations in color or consistency were defined as macronodules (International Working Party, 1995). The following morphological parameters



analyzed were: presence of steatosis, ballooning cells, apoptosis, necrosis, Mallory bodies, ductular proliferation and inflammation (periportal and acinar). These parameters were classified according to the intensity in 5 grades.

#### *Statistical analyses*

Data were analyzed using Student's *t*-test or ANOVA, followed by Newman-Keuls, with the aid of Prism Software (version 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant if *P* was equal to or less than 0.05.

## Results

### *Macroscopic aspects*

Chronic administration of CCl<sub>4</sub> in C57Bl/6 caused progressive morphological alterations in the liver. In mice treated with CCl<sub>4</sub> with or without EtOH during 6 to 8 months, the livers had grossly nodular surface and were brown-colored (Figures 1a-c). The organ's consistency was harder compared to that of normal livers. The normal parenchyma was replaced by regenerative nodules (Figures 1d and e) of  $453 \pm 199$   $\mu\text{m}$  diameter (ranging from 196 to 770  $\mu\text{m}$ ). Vascular alterations, including dilation of portal vein, were observed (Figures 1a and c). The survival in 6 months of CCl<sub>4</sub>+EtOH administration was about 70% (37/53).

### *Microscopic study*

Short-term administration (24 days) of CCl<sub>4</sub> in C57Bl/6 mice caused hepatocyte necrosis with mixed inflammatory infiltrates with a predominance of mononuclear cells, especially in centrilobular areas (data not shown). At this time point, there was a discrete hepatocellular ballooning, without steatosis. Some incomplete fibrous septa linking vascularized structures were also observed. After a longer period of CCl<sub>4</sub> administration (2 to 5 months), the normal liver architecture was replaced by nodules of regenerating liver cell plates surrounded by fibrous septa. In this phase, there was a discrete ductular proliferation, which was accentuated with time of drug administration (data not shown).

Cirrhosis was established after 6 months of stimulus with CCl<sub>4</sub>, in the presence or absence of EtOH. It was characterized by remarkably well defined fibrous tissue surrounding nodules of regenerative hepatocytes, causing profound abnormalities in the liver architecture (Figures 1d and e). Some cirrhotic nodules and regenerative

macronodules had microvacuolar hepatocellular steatosis, areas of cellular ballooning (Figures 1f and g) and, frequently, the presence of Mallory bodies (Figure 1h). After 8 months of CCl<sub>4</sub> administration, about 85% (11/13) of untreated and 95% (17/18) of the animals treated with EtOH had well-established cirrhosis, while the remaining had incomplete septal cirrhosis constituted by partial formation of nodules delimited by septal fibrosis. Ductular cells proliferation, present in earlier time points of CCl<sub>4</sub> administration (Figure 1h), was more evident after 8 months of treatment. Table 1 summarizes the main morphological aspects.

#### *Development of hepatocellular carcinoma*

After 8 months of CCl<sub>4</sub> administration, 53% (7/13) and 61% (11/18) of the animals treated with or without EtOH had regenerative macronodules, respectively. Alterations characteristics of malignant transformation (HCC) were seen in 46% (6/13) and 22% (4/18) of the animals treated with or without EtOH, respectively. These were characterized by areas of proliferation of small hepatocytes with increased nuclear:cytoplasmic ratio, basophilic cytoplasm and atypical mitosis, disposed in plates of more than 2 cells of thickness (Figure 2c). Occasionally these cell changes were seen within regenerative macronodules, giving rise to the aspect of “nodules inside nodules” (Figures 2a-c). Areas of high grade dysplastic hepatocytes organized into trabeculae were found within cirrhotic regenerative nodules (Figure 2c, d and f). Groups of neoplastic hepatocytes were seen invading hepatic vein branches (Figures 2e and f). Neoplastic changes were observed in 100% (6/6) animals after 14 months of treatment with CCl<sub>4</sub>.

*Morphometric evaluation of fibrosis*

Liver sections from animals treated for at least 3 months with CCl<sub>4</sub> had a higher percentage of hepatic fibrous tissue when compared to those of normal animals (Figure 3;  $P < 0.005$ ). In animals treated only with CCl<sub>4</sub>, the percentage of liver fibrosis was lower than that of mice treated CCl<sub>4</sub> combined to EtOH during 6 months (CCl<sub>4</sub>:  $10 \pm 5.8$  compared CCl<sub>4</sub>+EtOH:  $13 \pm 6.0$ ;  $P < 0.005$ ). Similar results were obtained with the analysis of livers of mice treated during 8 months (not shown).

## Discussion

In this study we show that prolonged administration of the hepatotoxic drug CCl<sub>4</sub>, combined or not with EtOH, can induce cirrhosis in C57Bl/6 mice, with similar features to the ones found in human liver cirrhosis. In addition to septal fibrosis and regenerative nodules, the mouse model presents several other features described in human cirrhosis associated with oxidative stress, such as: (i) steatosis; (ii) hepatic ballooning cells; (iii) Mallory bodies; (iv) complete and incomplete septal fibrosis and (iv) vascular alterations. Macroregenerative nodules, dysplastic hepatocytes and high grade dysplastic cells and development of HCC were observed after 8 months of CCl<sub>4</sub> administration, which was akin to the alterations found in human cirrhosis-associated carcinogenesis (Crawford 2002; Libbrecht *et al.* 2005).

In this model we observed the presence of lesions similar to the precursor lesions described in the development of HCC in cirrhotic human livers. Good animal models that mimic human HCC allow the evaluations from pre-neoplastic up to metastatic lesions, being useful for unravelling the morphological and molecular features of this disease (Libbrecht *et al.* 2005). Furthermore, cirrhosis and HCC developed in a context of necro-inflammation and oxidative stress similar to what has been described in humans. In addition, we used normal mice to induce HCC, whereas other studies used transgenic mice for HCC development (Factor *et al.* 2000; Harada *et al.* 2004). Thus, the molecular basis of hepatocarcinogenesis in this model may to be exploited and correlated to what has been observed in studies using human tissue. An interesting aspect of this model is the longer period of drug administration required for the onset of the lesion, compared to the rat model (at least 6 months in mice, and 4 months in rats) for the development of cirrhosis. In addition, the dose of CCl<sub>4</sub> necessary to induce cirrhosis in mice was 2.5-fold higher than that used in rats

(Tamayo 1983; Lee *et al.* 2005). The same dose used in rats did not induce cirrhosis in mice (data not shown). This is in agreement with the work done by Nagano and co-workers (2007) by inhalation exposure of CCl<sub>4</sub>. This indicates that mice may have a greater ability to regenerate hepatic lesions compared to rats or to cope with oxidative stress.

Previous reports have evaluated the development of cirrhosis in CCl<sub>4</sub>-treated mice. Stowell *et al.* (1951) found that A strain mice developed cirrhosis and hepatocellular carcinoma after 6 and 15 weeks of treatment with CCl<sub>4</sub>, respectively. In contrast, Quinn and Higginson (1965) did not observe the establishment of morphological alterations characteristic of cirrhosis in CFW mice treated with CCl<sub>4</sub> during one year. Chang *et al.* (2005) reported that administration of CCl<sub>4</sub> in FVB mice caused high mortality and induced cirrhosis in a period varying from 4 to 20 weeks of treatment. The differences found in the literature and in our work may be attributed to variations in the genetic background of the mice, in addition to differences in the doses of CCl<sub>4</sub> used to induce cirrhosis. We chose to establish a model of cirrhosis in C57Bl/6 mice because many mutant strains of mice (transgenics and knockouts) have this genetic background, allowing the use of these genetic tools for the investigation of the process of cirrhosis and hepatocellular carcinoma development.

Alcohol consumption causes an increase of CCl<sub>4</sub> metabolism and, consequently, in its hepatotoxicity (Allis *et al.* 1996). In our study, however, the oxidative stress caused by ethanol administration did not accelerate the development of cirrhosis, compared to mice treated only with CCl<sub>4</sub>. This may be explained by the high dose of CCl<sub>4</sub> used in this model, which alone causes a severe hepatic damage. Although the cirrhosis characteristics were similar in mice treated or not with

ethanol, a higher percentage of fibrosis was found in livers of ethanol-treated mice, reflecting a more pronounced inflammation elicited by this combination. Future analyses of the expression of genes related to fibrosis deposition altered by CCl<sub>4</sub> administration (Jiang *et al.* 2004), in CCl<sub>4</sub>-treated mice with or without ethanol ingestion may elucidate the role of ethanol in hepatic fibrosis.

The genotoxic potential of CCl<sub>4</sub> in cirrhosis-associated HCC development has been a matter of debate. Extremely high doses of CCl<sub>4</sub>, such as the one used in our model, cause increased DNA strand breaks, suggesting a weak genotoxic effect of this hepatotoxic substance, at least in this condition (Beddowes *et al.* 2003). This genotoxic effect, associated with cytotoxicity and compensatory hyperplasia, may contribute to the carcinogenic effects exerted by CCl<sub>4</sub>. Most of the alterations in gene expression caused by CCl<sub>4</sub>, however, are normalized after withdrawal of its administration (Jiang *et al.* 2004). On the other hand, cirrhosis by itself is associated with hepatocyte proliferation, which increases the probability of cumulative mutations and carcinogenesis.

In conclusion, the mouse model of cirrhosis described herein is similar to the disease in humans and may be useful for the understanding of the pathological mechanisms, HCC development, as well as for therapeutic development. Such a model will possibly be helpful for future establishment of cells obtained from transgenic mice models in order to evaluate the role of specific cell populations and soluble factors involved in the pathogenesis of the disease. Of special interest is the study of stem cells in liver regeneration and HCC development, a subject that is now under investigation. The understanding of the molecular mechanisms of liver repair in mice may be of interest for the development of therapeutic strategies for human cirrhosis and HCC.

**Acknowledgements**

This work was supported by grants from CNPq, FIOCRUZ and FAPESB.



## References

- Allis J.W., Brown B.L., Simmons J.E., Hatch G.E., McDonald A., House D.E. (1996) Methanol potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity: the central role of cytochrome P450. *Toxicology* **112**, 131-140.
- Beddowes E.J., Faux S.P., Chipman J.K. (2003) Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* **187**, 101-115.
- Borzio M., Roncalli M., Treré D., Derenzini M.(1998)Preneoplastic cellular changes in liver.*Hepatology*.**28**,1435.
- Chang, M.L., Yeh, C.T., Chang, P.Y., Chen, J.C. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. (2005) *World J. Gastroenterol.*, **11**, 4167-4172.
- Crawford J.M. (2002) Liver cirrhosis. In MacSween R. N. M. et al. eds. *Pathology of the Liver*. 4th ed. Philadelphia: St Louis, pp 575-619.
- Factor V.M., Laskowska D., Jensen M.R., Weitach J.T., Popescu N.C., Thorgeirsson S.S. (2000) Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 2196-2201.
- Harada N., Oshima H., Katoh M., Tamai Y., Oshima M., Taketo M.M.(2004) Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res*. **64**,48-54.
- Jiang Y., Liu J., Waalkes M., Kang Y.J. (2004) Changes in the gene expression associated with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis persist after cessation of dosing in mice. *Toxicol. Sci*. **79**, 404-410.

- Junqueira L.C., Bignolas G., Brentani R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447-455.
- Keeffe E.B. (2001) Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement. *Gastroenterology*, **120**, 749-762.
- Kew M.C., Popper H. (1984) Relationship between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. *Sem. Liver Dis.* **4**,136-146.
- Kumar M., Kumar R., Hissar S.S., Saraswat M.K., Sharma B.C., Sakhuja P., Sarin S.K. (2007) Risk factors analysis for hepatocellular carcinoma in patients with and without cirrhosis: a case-control study of 213 hepatocellular carcinoma patients from India. *J Gastroenterol Hepatol.* **22**, 1104-1111.
- Libbrecht L., Desmet V., Roskams T. (2005) Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis. *Liver Int.* **25**, 16-27.
- Lee G.P., Jeong W.I., Jeong D.H., Do S.H., Kim T.H., Jeong K.S. (2005) Diagnostic evaluation of carbon tetrachloride-induced rat hepatic cirrhosis model. *Anticancer Res.* **25**, 1029-1038.
- Maggioni M., Coggi G., Cassani B., Bianchi P., Romagnoli S., Mandelli A., Borzio M.,Colombo P., Roncalli M. (2000) Molecular changes in hepatocellular dysplastic nodules on microdissected liver biopsies. *Hepatology.* **32**: 942-946.
- Nagano K., Umeda Y., Saito M., Nishizawa T., Ikawa N., Arito H., Yamamoto S., Fukushima S. (2007) Thirteen-week inhalation toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Occup Health.* **49**:249-59.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* **94**, 153-156.

- Plentz R.R., Caselitz M., Bleck J.S., Gebel M., Flemming P., Kubicka S., Manns M.P., Rudolph K.L. (2004) Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma. *Hepatology*. **40**, 80-86.
- Quinn P.S., Higginson J. (1965) Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. *Am J Pathol*. **47**:353-69.
- Stowell R.E., Lee C.S., Tsuboi K.K., Villasana A. (1951) Histochemical and microchemical changes in experimental cirrhosis and hepatoma formation in mice by carbon tetrachloride. *Cancer Res*. **11**:345-54.
- Sun M., Eshleman J.R., Ferrell L.D., Jacobs G., Sudilovsky E.C., Tuthill R., Hussein M.R., Sudilovsky O. (2001) An early lesion in hepatic carcinogenesis: loss of heterozygosity in human cirrhotic livers and dysplastic nodules at the 1p36-p34 region. *Hepatology*. **33**:1415-1424.
- Su Q., Benner A., Hofmann W.J., Otto G., Pichlmayr R., Bannasch P. (1997) Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Arch*. **431**:391-406.
- Tamayo R. P. (1983) Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* **3**, 112-120.
- Tiribelli C., Melato M., Croce L.S., Giarelli L., Okuda K., Ohnishi K. (1989) Prevalence of hepatocellular carcinoma and relation to cirrhosis: comparison of two different cities of the world- Trieste, Italy, and Chiba, Japan. *Hepatology* **10**, 998-1002.
- Tornillo L., Carafa V., Sauter G., Moch H., Minola E., Gambacorta M., Vecchione R., Bianchi L., Terracciano L.M. (2002) Chromosomal alterations in

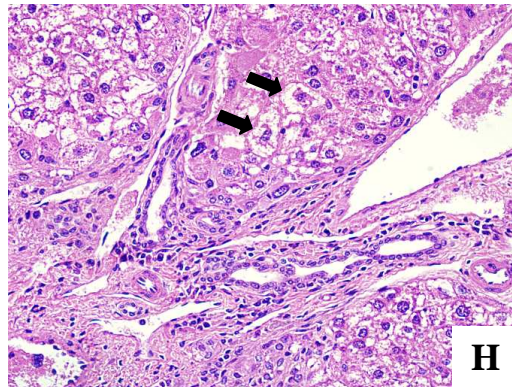
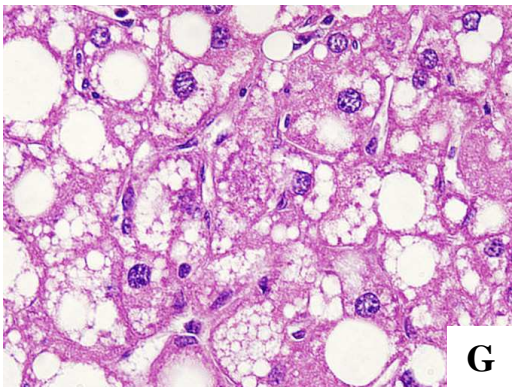
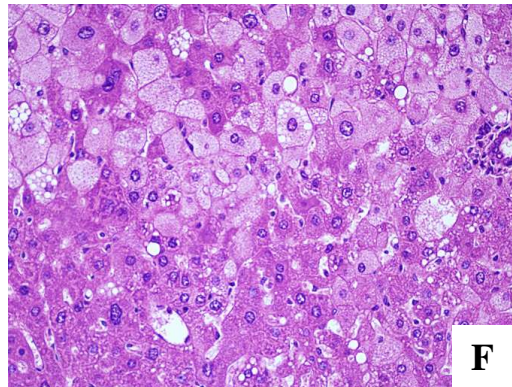
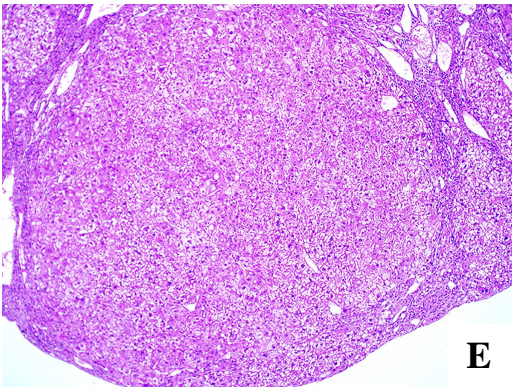
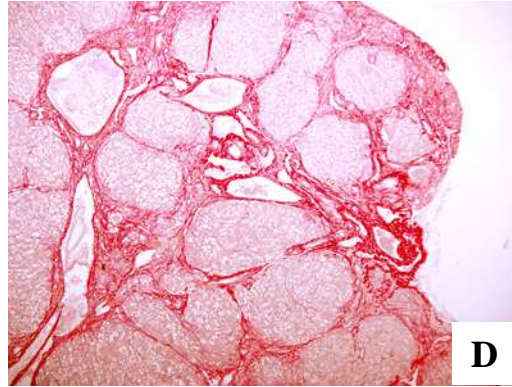
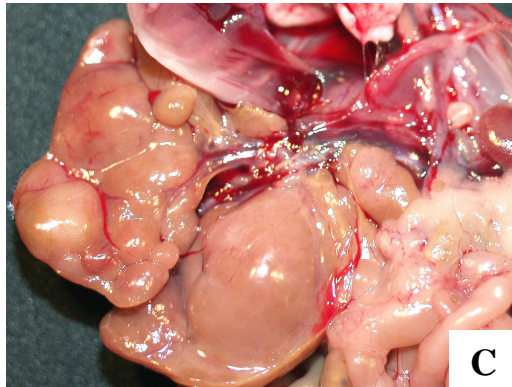
hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: high-grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma. *Lab Invest.* **82**, 547-553.

**Table 1: Morphological evaluation of livers from cirrhotic mice (8 months of CCl<sub>4</sub> administration)**

	CCl <sub>4</sub> (n=13)		CCl <sub>4</sub> +EtOH (n=18)		P-value
	%	grade	%	grade	
<b>Structural alterations</b>	15.4	3	5.6	3	0.7658
	84.6	4	94.4	4	0.7658
<b>Steatosis</b>	23.1	0	5.6	0	0.3718
	69.2	1	44.4	1	0.1711
	7.7	2	44.4	2	0.0621
			5.6	3	
<b>Ballooning cells</b>			5.6	0	
			22.2	1	
	23.1	2	33.3	2	0.8259
	76.9	3	33.3	3	0.0165
			5.6	4	
<b>Apoptosis</b>			50.0	0	
	69.2	1	33.3	1	0.0484
	30.8	2	5.6	2	0.1649
			11.1	3	
<b>Necrosis</b>			27.8	0	
	38.5	1	16.7	1	0.3408
	53.8	2	38.9	2	0.4089
			16.7	3	
	7.7	4			
<b>Mallory bodies</b>	61.5	1	27.8	1	0.0601
	23.1	2	33.3	2	0.8259
	15.4	3	33.3	3	0.4770
			5.6	4	
<b>Acinar inflammation</b>	15.4	1	38.9	1	0.1079
	84.6	2	50.0	2	<0.0001
			11.1	3	
<b>Periportal inflammation</b>	7.7	1	33.3	1	0.2114
	84.6	2	55.6	2	0.1872
	7.7	3	11.1	3	0.7658
<b>Ductular proliferation</b>	61.5	1	38.9	1	0.3473
	30.8	2	44.4	2	0.3647
	7.7	3	11.1	3	1.0000
			5.6	4	

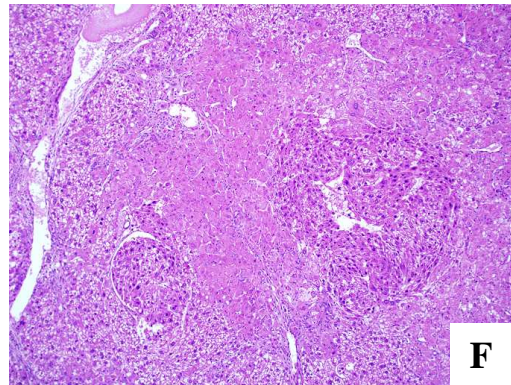
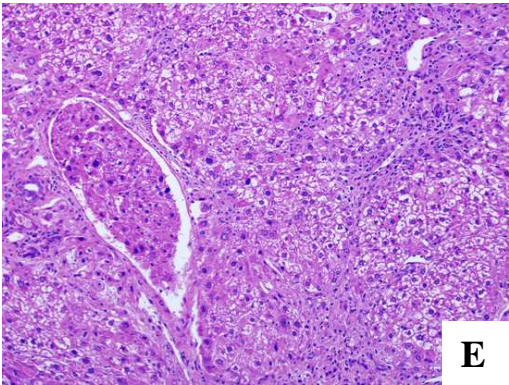
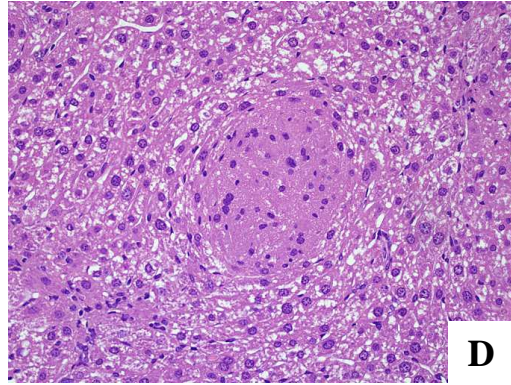
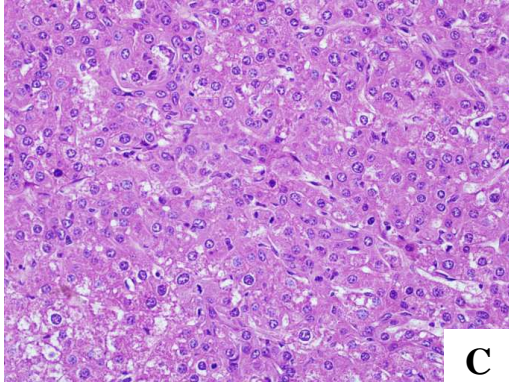
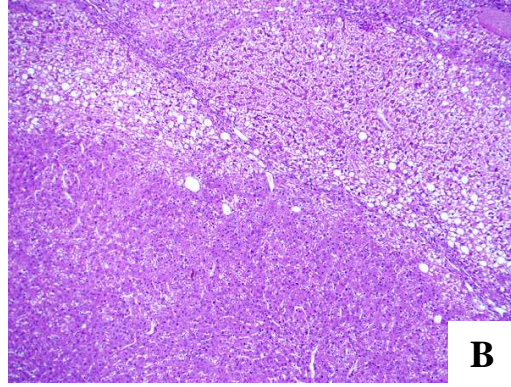
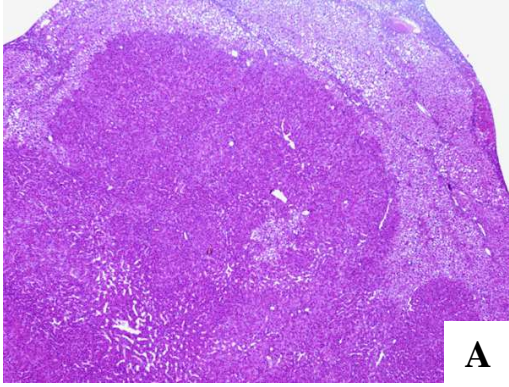
Grades: 0=absent; 1=mild; 2=moderate; 3=moderate to intense; 4=intense

**Figure 1** Macroscopic and morphological aspects of cirrhosis in mice submitted to CCl<sub>4</sub>+EtOH administration during 6-8 months. (a-c) Prominent areas of nodules (dark brown colored) in the liver surface of cirrhotic mice. Vascular alterations can be observed. (d) Hepatic nodules of variable size subdivided into irregular fibrous septa can be seen in picosirius red-stained section by optical microscopy (4x obj.). (e) Regenerative macronodule (H&E, 10x obj.). (f and g) Ballooning cells and micro and macrovacuolar steatosis (H&E; f: 20x obj.; g: 40x obj.). (h) Proliferation of ductular cells and presence of Mallory bodies (arrows) (H&E, 20x obj.).

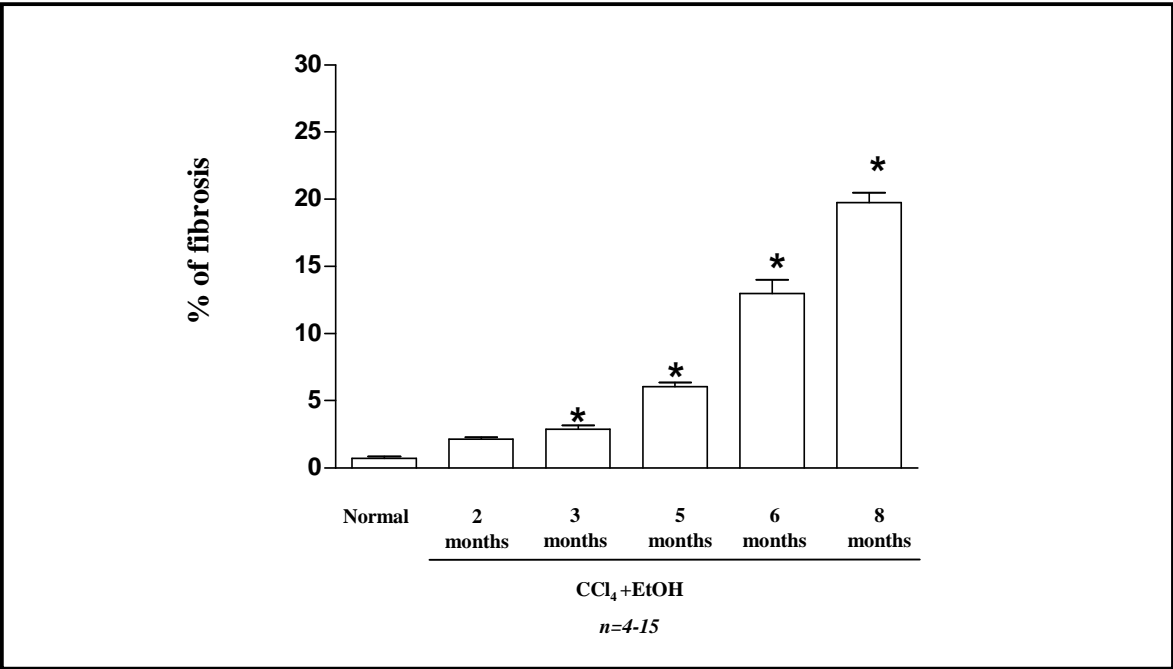


**Figure 2** Morphological features of hepatocellular carcinoma in mice treated with CCl<sub>4</sub> during 8 months. (a) Well-differentiated hepatocellular carcinoma (H&E, 4x). (b) Dysplastic nodules showing increased cellularity and high cell density (H&E, 10x). (c) Cord-like structures formed by hepatocytes are regrouping in trabeculae with irregular patterns. (H&E, 20x obj.). (d) Focus of atypical hepatocytes without encapsulation (H&E, 20x obj.). (e and f) Areas of vascular invasion by neoplastic hepatocyte-like cells (H&E; E: 20x obj.; F: 10x obj.).





**Figure 3** Percentage of liver fibrosis in mice treated with CCl<sub>4</sub> combined with EtOH. Mice were treated with CCl<sub>4</sub> and EtOH during 2-8 months. Picrosirius red-stained liver sections were analyzed as described in Materials and Methods. Values represent the means  $\pm$  SD of 4-15 mice per group. \*  $P < 0.05$ .



**4 MANUSCRITO II**

---

**Decreased fibrosis after cellular therapy in a mouse model of hepatic cirrhosis**

Sheilla Andrade de Oliveira<sup>a,b</sup>, Bruno Solano de Freitas Souza<sup>a</sup>, Carla Adriana Guimarães-Ferreira<sup>a</sup>, Siane Campos de Souza, Elton Sá Barreto<sup>a</sup>, Luiz Antonio Rodrigues de Freitas<sup>a</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>a,c</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, 40295-001 Salvador, BA, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil.

<sup>c</sup> Hospital São Rafael, Av São Rafael, 2152, São Marcos, 41256-900 Salvador, BA, Brazil.

**Running title: Bone marrow cells therapy in cirrhosis**

**Correspondence to:** Milena B. P. Soares. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ.

Rua Waldemar Falcão, 121 – Candeal, Salvador, BA. 40296-710. Brazil

E-mail address: [milena@cpqgm.fiocruz.br](mailto:milena@cpqgm.fiocruz.br)

Phone: +55-71-31762260

Fax: +55-71-31762292

**Financial support:** This work was supported by IMBT (CNPq/MCT), RENORBIO, FAPESB and FIOCRUZ.

### *Abstract*

**Introduction:** Cirrhosis is the final pathological condition of most chronic liver diseases and represents a common and difficult clinical challenge of worldwide importance. In the last 7 years many experimental studies were carried to evaluate the therapeutic efficacy of stem cells in liver diseases, mainly in acute injury models. In this study we evaluated the therapeutic efficacy of bone marrow cells (BMC) transplantation in a mouse model of cirrhosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) similar to the human pathology. **Materials and methods:** Groups of C57Bl/6 mice were treated with 0.2 ml of 20% CCl<sub>4</sub> in olive oil by oralgastric route twice a week, combined with 5% (v/v) ethanol in the drinking water during 6 months for cirrhosis induction. One or three doses of  $3 \times 10^7$  EGFP<sup>+</sup> cells/mouse were administered by intravenous route, once a week. Control mice received injections of saline in similar conditions. ELISA for TGF- $\beta$ , PCR for GFP DNA, immunofluorescence and morphometric studies were performed. **Results:** Mice treated with one dose of BMC had similar percentage of liver fibrosis, compared to saline-treated cirrhotic mice. A significant reduction in liver fibrosis was observed 2 months after therapy with 3 doses of BMC, which was sustained after 4 months. A decrease of TGF- $\beta$  levels was observed in the group treated with BMC when compared to saline-treated cirrhotic mice. GFP<sup>+</sup> BMC were observed in liver sections 1-3 days after transplantation, mainly small round-shaped cells. After one week of transplantation, GFP<sup>+</sup> cells could also be seen, but most cells had an elongated shape and localized at areas of fibrosis deposition. GFP DNA could be detected in liver fragments 2 months after transplantation. **Conclusion:** Bone marrow mononuclear cells migrate to the liver and cause fibrosis reduction in a mouse model of hepatic cirrhosis.

## *Introduction*

Cirrhosis is the final pathological condition of most chronic liver diseases and represents a common and difficult clinical challenge of worldwide importance. Resultant of different causes, chronic liver diseases have an ascending curve of morbidity, generating a considerable number of hospital admissions and are associated with a growing risk of death (Corrao *et al.*, 1998; Keeffe, 2001; Tsui *et al.*, 2006). The development of cirrhosis is initiated after an injury that causes liver tissue damage and hepatocytes proliferation. This process is associated with an inflammatory response and discrete depositions of extracellular matrix (ECM) proteins. If the proliferation of hepatocytes fails or if the hepatic injury persists, hepatocytes undergo necrosis or apoptosis and parenchymatous and non-resident cells are activated, releasing fibrogenic mediators which promote the replacement of functional areas of hepatocytes by ECM (Bataller & Brenner, 2005).

Advanced fibrosis causes changes in the hepatic architecture that can lead to hepatic failure. The hepatic transplant is the treatment of better results available for patients with liver failure (Keeffe, 2001). This procedure, however, is of high risk and depends on the availability of donated organs, with operative damage, risks of rejection, and high costs. In this context, new therapeutic strategies for liver failure are necessary.

Stem cell therapy has becoming an attractive option of treatment for chronic degenerative diseases (Mimeault *et al.*, 2007). Various stem cell populations have a potential to differentiate into different cell types, including hepatocytes (Jones, 2002; Hong *et al.*, 2005). Although the number of reports showing the therapeutic potential of stem cells is increasing, the mechanisms involved in the regenerative process induced by cell transplantation are still unclear. Nonetheless, the possibility of improvement of the function of organs such as the liver in conditions to which there are no currently available treatments by using cell-based therapies is highly attractive.

In the last seven years many experimental studies were carried out to evaluate the therapeutic efficacy of stem cells in hepatic injury. In general, these investigations were done using acute experimental models, showing improvement of biochemical aspects with decrease of serum transaminases (Lagasse *et al.*, 2000; Oyagi *et al.*, 2006) and bilirubin (Lagasse *et al.*, 2000; Vassiloupoulos, 2003) and increased albumin (Oyagi, 2006) and prothrombin time (Jang *et al.*, 2004). The number apoptotic cells (Caplan *et al.*, 2006), the inflammatory infiltrate and the accumulation of fibrosis tissue (Fang *et al.*, 2004; Sakaida *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2005; Higashiyama *et al.*, 2007) decline after therapy with stem cells, while the hepatic regeneration is improved (Hussain *et al.*, 2005; Yannaki *et al.*, 2005). In some reports, the animals also had reduction in mortality (Di Campli *et al.*, 2004; Sakaida *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005).

Although the results obtained with cellular therapy for liver diseases have been promising, new studies using models of chronic liver diseases are needed, since most cases of human hepatic failure results of chronic injuries. In this study we evaluated the therapeutic efficacy of bone marrow cell therapy in a mouse model of cirrhosis induced by long-term administration of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Our results demonstrate that well-established chronic fibrosis can be modulated by transplantation of bone marrow cells in cirrhotic mice, reinforcing the study of cellular therapy in patients with chronic liver diseases.



## *Materials and methods*

### *Animals*

Three weeks-old male C57Bl/6 wild-type and 4 to 6 weeks-old female EGFP transgenic mice were used as recipients and as donors of bone marrow cells, respectively. All the animals weighting 20-23 g were raised and maintained at the Gonçalo Moniz Research Center/FIOCRUZ in rooms with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) and continuous air renovation. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle (6 am - 6 pm) and provided with rodent diet and water *ad libitum*. Animals were handled according to the NIH guidelines for animal experimentation. All procedures described here had prior approval from the local animal ethics committee.

### *Carbon tetrachloride administration*

Groups of 20 mice were treated with 0.2 ml of 20%  $\text{CCl}_4$  (MERCK, Germany) in olive oil by oralgastric route twice a week, combined with 5% (v/v) ethanol in the drinking water, during 6 months, for cirrhosis induction. Mortality rate was about 30% after 6 months of  $\text{CCl}_4$  administration. Normal control littermates were maintained in the same housing conditions.

### *Transplantation of bone marrow cells*

Bone marrow cells were obtained from femurs and tibiae of C57Bl/6 EGFP transgenic mice. Bone marrow mononuclear cells (BMC) were purified by centrifugation in Ficoll gradient (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) at  $1000 \times g$  for 15 min. After two washings in RPMI medium (Sigma), BMC were resuspended in saline, filtered over nylon wool and used for therapy in cirrhotic mice. One or three doses of  $3 \times 10^7$  cells/mouse (once a week) were administered by i.v. route (by retroorbital plexus). Control

mice received injections of saline in similar conditions. Mice were submitted to euthanasia at various times after therapy using ketamine and xylazine.

#### *TGF- $\beta$ assessment*

TGF- $\beta$  levels were measured by ELISA in total protein of homogenized liver tissue (50mg) in 100  $\mu$ l PBS containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 and protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinin A/100ml). The samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4° C and the supernatant was frozen at -80° C for later quantification. TGF- $\beta$  levels were measured using a sandwich ELISA assay following the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

#### *Morphological and morphometrical analyses*

Mice were perfused under anesthesia through the heart with 50 ml of PBS followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde at 4° C. Liver slices were fixed in Bouin or formalin at 10% and, after paraffin embedding, 5  $\mu$ m-thick sections were obtained and stained with conventional hematoxylin-eosin or with picrosirius-red method for collagen (Junqueira & Carneiro, 1979). Quantification of fibrosis was carried out in sections stained with picrosirius-red upon examination by optical microscopy. Ten fields/liver section were digitalized using a color digital video camera (CoolSnap, Montreal, Quebec, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and analyzed using Image Pro program (version 6.1; Media Cybernetics, San Diego, CA.) to quantify the percentage of fibrosis. The morphological and morphometrical analyses were carried out blinded.

Cirrhosis was defined by the presence of parenchymatous nodules delimited by fibrosis occupying all or most of liver parenchyma. Nodules larger than 650  $\mu$ m or presenting with alterations in color or consistency were defined as macronodules

(International Working Party, 1995). The following morphological parameters analyzed were: presence of steatosis, ballooning cells, apoptosis, necrosis, Mallory bodies, ductular proliferation and inflammation (periportal and acinar). These parameters were classified according to the intensity in 5 grades.

#### *Immunofluorescence analyses*

Five- $\mu\text{m}$  frozen sections obtained at various times after transplantation were prepared and fixed in 4% cold paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The presence of transplanted GFP<sup>+</sup> BMCs in the liver tissue was analyzed by direct fluorescence. Oval cells were stained using a biotinylated anti-OV-6 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) followed by streptavidin Alexa 568 (Molecular Probes, Carlsbad, California). Nuclei were counter-stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (VectaShield Hard Set mounting medium with DAPI H-1500 Vector Laboratories, Burlingame, CA). The presence of fluorescent cells was determined by observation in a BX61 microscope with epifluorescence system plus grid to enhance the fluorescence resolution (Optigrid, Structured- light Imaging System, Thales Optem inc, USA) using appropriate filters (Olympus). Images were captured using a color digital video SPOT flex camera (15.2, 64 Mp, Shifting Pixel, Diagnostic Instruments inc, USA).

#### *Polymerase chain reaction (PCR) for GFP*

The presence of donor-derived DNA in liver tissue was analyzed 2 months after BMC transplantation in cirrhotic mice. DNA was extracted from liver tissue using a DNA extraction kit (QIAamp® DNA Mini Kit -50, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA samples concentration was quantified in 1  $\mu\text{l}$  in a spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). All samples were

diluted to 100-200 ng/ $\mu$ l. PCR amplification of GFP cDNA was performed using Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) using standard procedures and the following primers pair (Invitrogen): forward, 5' CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G 3', reverse, 5' CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G 3'.

#### *Biochemical analysis*

For the assessment of hepatic injury, serum levels laboratory tests consisted of complete blood count prothrombin time and albumin levels, serum albumin levels, serum aminotransferase levels, alkaline fosfatase and gamma-glutamyl transferase levels.

#### *Statistical analyses*

Data were analyzed using Student's *t*-test or ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test, with the aid of Prism Software (version 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant if *P* was equal to or less than 0.05.

## **Results**

### *Decreased fibrosis in livers of BMC-treated cirrhotic mice*

Chronic administration (at least 6 months) of CCl<sub>4</sub> and EtOH in C57Bl/6 mice causes the development of well-established cirrhosis (our unpublished results). To test the effects of BMC therapy, cirrhotic mice were treated with one or three doses of BMC, once a week during the first three weeks. Mice treated with only one dose of BMC had similar percentage of liver fibrosis 2 months after cell therapy, compared to saline-treated cirrhotic mice (BMC-treated=5.2±1.5 versus saline-treated=4.9±1.2; P>0.05). In contrast, a significant reduction in liver fibrosis was observed 2 months after therapy with 3 doses of BMC (Figures 1A, 2A and B). This difference in percentage of fibrosis was also observed 4 months after BMC therapy (Fig 1B).

The levels of TGF- $\beta$ , a cytokine related to fibrosis deposition, were assessed in liver fragments obtained 2 months after BMC therapy. A tendency to a reduction in liver TGF- $\beta$  levels was observed in the group treated with BMC when compared to saline-treated cirrhotic mice, although the difference was not statistically significant (P=0.08). TGF- $\beta$  levels in BMC-treated mice were similar to those of normal mice (Figure 3).

### *Morphological and biochemical aspects*

The morphological evaluation of liver sections of mice treated with BMC or saline showed a regression of cirrhosis in both groups 2 months after withdrawal of the hepatotoxic stimulus (Table 1). However, there were no significant differences in the degree of structural alterations when the group treated with BMC or saline were compared. The degree of necrosis, ballooning cells and inflammation in sections of BMC-treated mice was also similar compared to saline-treated mice.

Several serological parameters (prothrombin time, albumin,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase) were assayed in normal and cirrhotic mice submitted or not to BMC therapy (Table 2). We did not find any significant alteration in the levels of the parameters studied comparing normal and cirrhotic mice, before or after BMC therapy.

*Transplanted BMC migrate to cirrhotic liver*

GFP<sup>+</sup> BMC were observed in liver sections of cirrhotic mice 1-3 days after transplantation (Figures 4A-D). At this time point, GFP<sup>+</sup> cells had mainly small round-shapes and were found in portal areas. After one week of transplantation, GFP<sup>+</sup> cells could also be seen, but most cells had an elongated shape and were localized at areas where large autofluorescent cells were found (Figures 4E and F). These enlarged, autofluorescent cells were present in liver sections of cirrhotic mice treated or not with BMC, and were mainly located in areas of fibrosis in portal areas (Figs. 2 C and D). These autofluorescent cells were seen close to OV-6<sup>+</sup> cells in liver sections of cirrhotic mice (Figure 2E).

Bright GFP<sup>+</sup> cells were not found in liver sections of mice sacrificed 2 months after BMC therapy (data not shown). However, GFP DNA could be detected at this time point, indicating the presence of donor-derived cells in the hepatic parenchyma (Figure 5).

## *Discussion*

A growing number of reports have shown that transplantation of bone marrow cells causes improvement of damaged liver in experimental models (Lagasse *et al.*, 2000; Vassiloupoulos *et al.*, 2003; Fang *et al.*; 2004, Jang *et al.*, 2004; Sakaida *et al.*, 2004; Yannaki *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Oyagi *et al.*, 2006). In this study we show a beneficial effect of BMC therapy in a model of well established cirrhosis in mice, with characteristics similar to the human disease (our unpublished results). This finding is of great relevance because cirrhosis is the end-stage of chronic liver diseases, when this kind of therapy is mostly needed.

It is well known that cirrhosis induced by CCl<sub>4</sub> in mice is reversible after withdrawal of stimulus (Pérez-Tamayo, 1979; Di Vinícius *et al.*, 2005). However, a marked reduction in liver fibrosis was observed 2 and 4 months after therapy, indicating that BMC accelerate the degradation of fibrosis. The finding of GFP<sup>+</sup> cells in areas of fibrosis suggests that a proportion of the transplanted cells may cause the decrease of fibrosis deposited in the liver by secreting anti-fibrogenic factors directly or by modulating the activity of other cells present in the damaged tissue. In fact, Higashiyama *et al.* (2007) demonstrated that transplanted bone marrow cells found in the liver secrete metalloproteinases, indicating that these cells may indeed contribute directly to fibrosis regression.

TGF- $\beta$  is a key cytokine in fibrosis deposition in various organs, including the liver (Gressner & Weiskirchen, 2006). This cytokine is mainly produced by hepatic stellate cells and stimulates the production of extracellular matrix components. In our study we found a decrease of TGF- $\beta$  levels in liver fragments of mice treated with BMC, compared to untreated cirrhotic mice, although the differences were not statistically significant. In another study using a model of chronic liver disease caused by *Schistosoma mansoni*

infection, we observed a significant decrease of TGF- $\beta$  levels (Oliveira *et al.*, submitted for publication). TGF- $\beta$  also inhibits hepatocytes proliferation (Nguyen *et al.*, 2007). In concert, our data reinforce the importance of this cytokine on fibrosis deposition and stimulate the development of therapeutic methods of TGF-  $\beta$  modulation.

In this study we found an apparent change in the morphology of GFP<sup>+</sup> cells a few days after transplantation to a spindle-like shape, mainly located in areas of fibrosis. We also observed this phenomenon in a model of chronic fibrosis induced by *Schistosoma mansoni* infection (Oliveira *et al.*, submitted for publication). The recent demonstration that myofibroblasts found in human fibrotic livers are of bone marrow origin suggests that these spindle-like GFP<sup>+</sup> cells, which play a key role in ECM proteins degradation, may be myofibroblasts (Forbes *et al.*, 2004).

A marked feature of the chronic injury caused by CCl<sub>4</sub> administration observed in this study was the presence of large autofluorescent cells in areas of fibrosis. Based on the morphology and location, we suggest that these are Kupffer cells with accumulation of neutral lipids, known to be autofluorescent, in their cytoplasm during the chronic insult (Quintana-Bustamante *et al.*, 2006). In addition, these large cells were found near oval cells, known to be precursor cells in the liver. Kupffer cells are critical for oval cells proliferation (Olynyk *et al.*, 1998), probably by secretion of soluble mediators such as TNF- $\alpha$  (Lowes *et al.*, 2003). Whether the transplanted BMC interact with these cells is still to be determined.

The origin of hepatic oval cells has been intensely studied during the last years. Paku *et al.* (2001) suggested that oval cells come from the bile ducts of the portal region. However, studies in rats suggested that oval cells are derived from precursors in the bone marrow (Petersen *et al.*, 1999). Despite this matter of controversy, it is well established that hepatic stem cells participate in the recovery process of liver with severe injury or impaired



hepatocyte regeneration. This is probably occurring in our model, since a significant number of OV-6<sup>+</sup> cells are found in liver sections of CCl<sub>4</sub>-treated mice (Fig. 2E), whereas sections of normal livers contain undetectable or scarce OV-6<sup>+</sup> cells (not shown), suggesting that oval cells are proliferating.

In conclusion, the present study clearly shows that transplanted bone marrow cells migrate, persist and contribute for the degradation of carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. A more comprehensive understanding of bone marrow cells physiology in hepatic diseases is essential to improve the likelihood that such treatment will result in successful clinical treatments for intractable liver fibrosis in humans.

#### *Acknowledgements*

The authors thank Carine Machado Azevedo and Juliana F. V. Senra for technical assistance.

## *References*

- BATALLER R., BRENNER D.A. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005, 115:209-218.
- CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 2006, 98:1076-1084.
- CORRAO, G.; ARICO, S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology* 1998, 27: 914-919.
- DI CAMPLI, C., PISCAGLIA, A.C., PIERELLI, L., RUTELLA, S., BONANNO, G., ALISON, M.R., MARIOTTI, A., VECCHIO, F.M., NESTOLA, M., MONEGO, G., MICHETTI, F., MANCUSO, S., POLA, P., LEONE, G., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004, 36: 603-613.
- DI VINICIUS I, BAPTISTA AP, BARBOSA AA, ANDRADE ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. *Pathol. Res. Pract.* 2005, 201: 449-456.
- FANG, B., SHI, M., LIAO, L., YANG, S., LIU, Y., ZHAO, R.C. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004, 78: 83-88.
- GRESSNER, A.M., WEISKIRCHEN, R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J. Cell. Mol. Med.* 2006, 10:76-99.
- HIGASHIYAMA, R., INAGAKI, Y., HONG, Y.Y., KUSHIDA, M., NAKAO, S., NIIOKA, M., WATANABE, T., OKANO, H., MATSUZAKI, Y., SHIOTA, G., OKAZAKI, I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2007,45:213-222.

OLYNYK JK, YEOH GC, RAMM GA, CLARKE SL, HALL PM, BRITTON RS, BACON BR, TRACY TF. Gadolinium chloride suppresses hepatic oval cell proliferation in rats with biliary obstruction. *Am J Pathol.* 1998, 152:347-52.

HONG, S.H., GANG, E.J., JEONG, J.A., AHN, C., HWANG, S.H., YANG, I.H., PARK, H.K., HAN, H., KIM, H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330(4):1153-61, 2005.

HUSSAIN, S.Z., STROM, S.C., KIRBY, M.R., BURNS, S., LANGEMEIJER, S., UEDA, T., HSIEH, M., TISDALE, J.F. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig Dis Sci* 2005, 50: 1755-1763.

JANG, Y.Y., COLLECTOR, M.I., BAYLIN, S.B., DIEHL, A.M., SHARKIS, S.J. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion: *Nat Cell Biol.* 2004, 6:532-539.

JONES, E.A., TOSH, D., WILSON, D.I., LINDSAY, S., FORRESTER, L.M. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Experimental Cell Research* 272(1): 15-22, 2002.

JUNQUEIRA, L.C., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979, 11: 447-455.

KEEFFE, E.B. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement, Keeffe EB. *Gastroenterology* 2001, 120: 749-762.

LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L., WANG, X., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I.L., GROMPE, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000, 6:1229-1234.

LOWES, K.N., CROAGER, E.J., OLYNYK, J.K., ABRAHAM, L.J., YEOH, G.C. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Jan;18(1):4-12.

MIMEAULT, M., HAUKE, R., BATRA, S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics- recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther.* 2007, 82:252-264.

NGUYEN, L.N., FURUYA, M.H., WOLFRAIM, L.A., NGUYEN, A.P., HOLDREN, M.S., CAMPBELL, J.S., KNIGHT, B., YEOH, G.C., FAUSTO, N., PARKS, W.T. Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology.* 2007, 45:31-41.

OLIVEIRA, S.A., FREITAS, L.A.R., DUTRA, A. A. N., SOUZA, B.S.F., SA, M. S., VASCONCELOS, J.F., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., SOARES, M.B.P. Characterization of hepatic cirrhosis in mice. Submitted for publication.

OYAGI, S.; HIROSE, M.; KOJIMA, M.; OKUYAMA, M.; KAWASE, M.; NAKAMURA, T.; OHGUSHI, H.; YAGI, K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. *J. Hepatol* 2006, 44: 742-748.

PAKU, S., SCHNUR, J., NAGY, P., THORGEIRSSON, S.S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.* 2001, 158:1313-23.

PETERSEN, B.E., BOWEN, W.C., PATRENE, K.D., MARS, W.M., SULLIVAN, A.K., MURASE, N., BOGGS, S.S., GREENBERGER, J.S., GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999, 284:1168-70.

QUINTANA-BUSTAMANTE, O., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., KOFMAN, A.V., FABREGAT, I., BUEREN, J.A., THEISE, N.D., SEGOVIA, J.C. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 2006, 43:108-116.

FORBES S.J., RUSSO, F.P., REY, V., BURRA, P., RUGGE, M., WRIGHT, N.A., ALISON, M.R. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004, 126: 955-963.

PÉREZ-TAMAYO R. Cirrhosis of the liver: a reversible disease? *Pathol Annu.* 1979;14 2:183-213.

SAKAIDA, I., TERAJ, S., YAMAMOTO, N., AOYAMA, K., ISHIKAWA, T., NISHINA, H., OKITA Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004, 40: 1304-1311.

TANG, X.P., YANG, X., TAN, H., DING, Y.L., ZHANG, M., WANG, W.L. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. *World J. Gastroenterol* 2003, 9, 1999-2003.

TSUI, J.I.; PLETCHER, M.J.; VITTINGHOFF, E.; SEAL, K.; GONZALES, R. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. *J. Hepatol* 2006, 44: 262-266.

VASSILOPOULOS, G., WANG P.R., RUSSELL, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003, 422:901-904.

YANNAKI, E.; ATHANASIOU, E.; XAGORARI, A.; CONSTANTINO, V.; BATSIS, I.; KALOYANNIDIS, P.; PROYA, E.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; FASSAS, A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp. Hematol.*, 2005, 33: 108-119.

ZHAO, D.C., LEI, J.X., CHEN, R., YU, W.H., ZHANG, X.M., LI, S.N., XIANG, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005, 11: 3431-3440.

**Table 1. Morphological evaluation of livers from cirrhotic mice 2 months after BMC therapy**

	CCl <sub>4</sub> + therapy (n=14)		CCl <sub>4</sub> +saline (n=14)		p-value
	%	grade	%	grade	
<b>Structural alterations</b>	78.6	3	86	3	0.9858
	21.4	4	14	4	0.9858
<b>Steatosis</b>	-	-	-	-	
<b>Ballooning cells</b>	7	0	43	0	0.07787
	93	1	57	1	0.07787
<b>Apoptosis</b>	-	-	-	-	
<b>Necrosis</b>	86	0	64.5	0	0.3788
	14	1	28.6	1	0.6299
			7.1	2	
<b>Mallory bodies</b>	-	-	-	-	
<b>Acinar inflammation</b>	7	0			
	64.5	1	64.3	1	1,0000
	28.5	2	14.3	2	0.6489
			21.3	3	
<b>Periportal inflammation</b>	71.4	1	57.1	1	0.6928
	21.5	2	28.6	2	1,0000
	7.1	3	14.3	3	0.996
<b>Ductular proliferation</b>	-	-	-	-	

Grades: 0=absent; 1=mild; 2=moderate; 3=moderate to intense; 4=intense

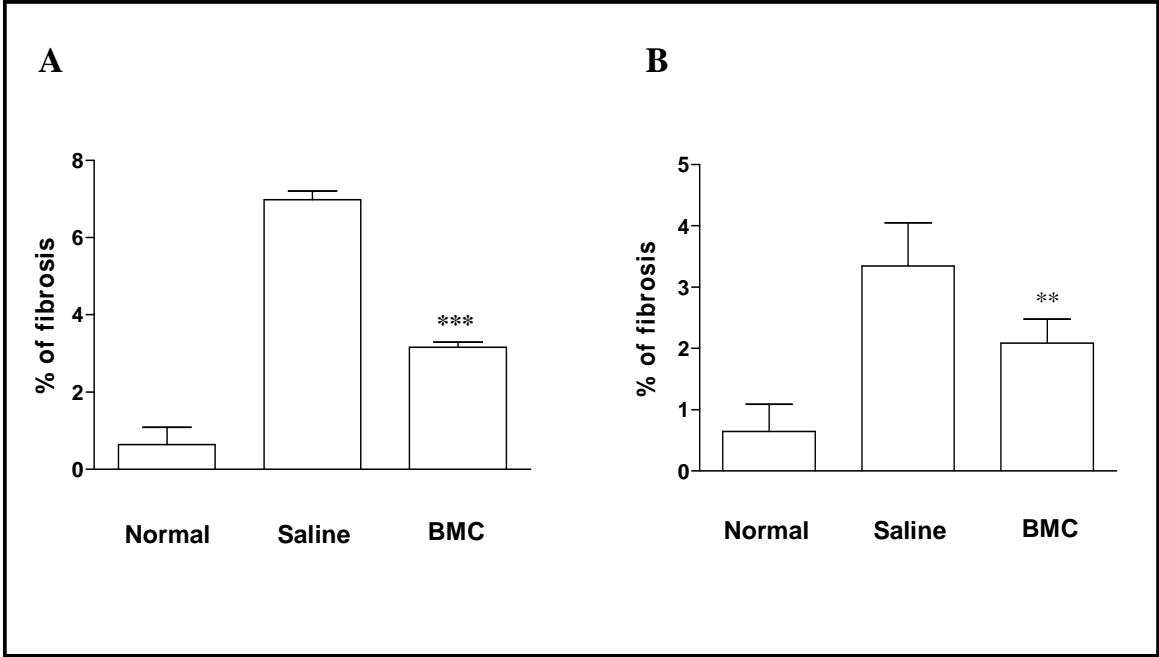
**Table 2. Biochemical analyses of parameters related to hepatic function**

	<b>Normal (n= 4-7)</b>	<b>Cirrhotic (n= 4-8)</b>	<b>BMC (n= 4-9)</b>	<b>Saline (n= 4-9)</b>
<b>TP (s)</b>	13.6 ± 1.9	15.8 ± 4.1	13.7 ± 2.4	12.8 ± 2.1
<b>Albumin (mg/dL)</b>	3.3 ± 3.3	3.37 ± 0.2	3.24 ± 3.2	3.0 ± 3.0
<b>GGT (IU/L)</b>	1.5 ± 1.5	1.0 ± 0	1.0 ± 0	1.0 ± 0
<b>AP (IU/L)</b>	248.1 ± 59.4	270.6 ± 52.1	271.2 ± 38.3	199.4 ± 75.1
<b>AST (IU/L)</b>	129.4 ± 117.3	21.5 ± 19.3	214.8 ± 341.3	78.6 ± 19.2
<b>ALT (IU/L)</b>	106.1 ± 162.4	52.1 ± 11.2	94.0 ± 136.2	31.6 ± 10.6

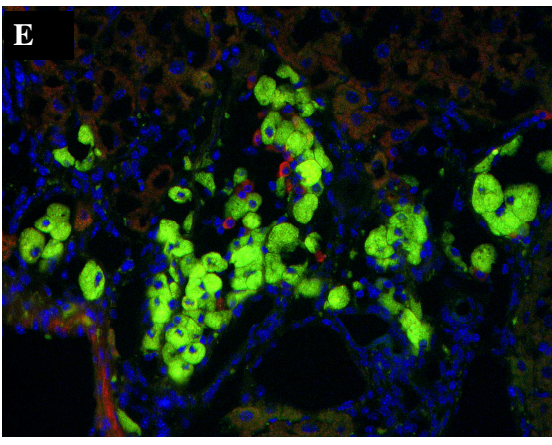
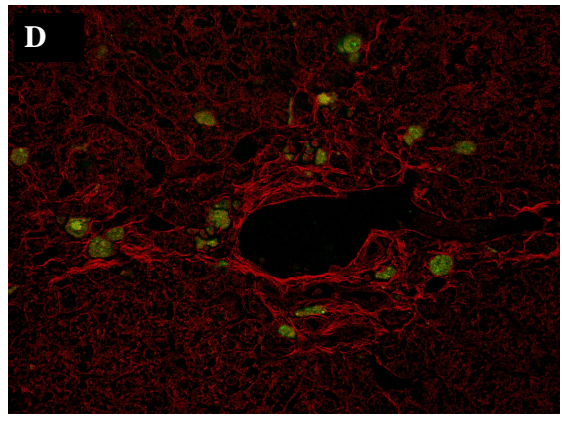
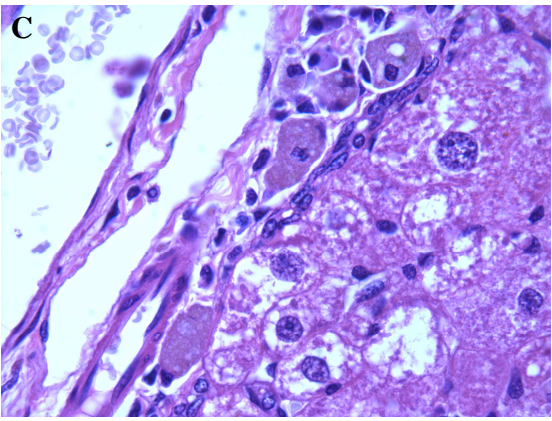
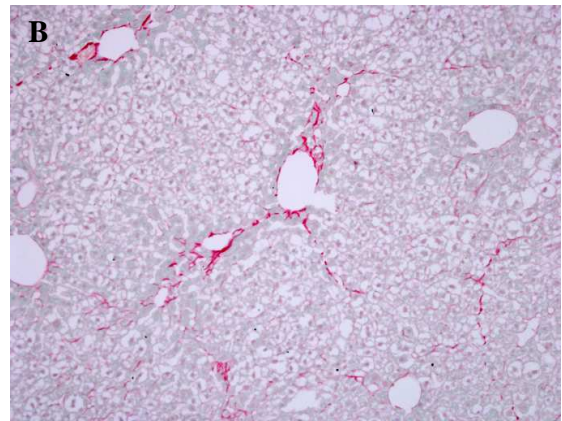
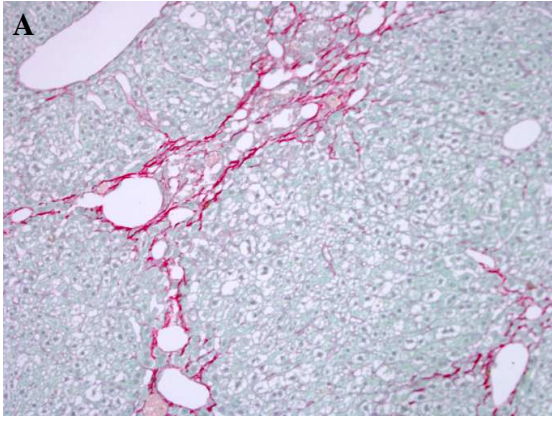
TP=prothrombin time; GGT= gamma-glutamyl transferase; AP= alkaline phosphatase; AST=aspartate aminotransferase; ALT= alanine aminotransferase

**Figure 1. Reduction of fibrosis after BMC therapy.** Normal and cirrhotic mice were treated with saline or BMC, and sacrificed 2 (**A**) or 4 (**B**) months after therapy. Liver sections sampled randomly and stained with Sirius red-Fast green were examined by optical microscopy. Images were digitalized and analyzed by morphometry. The percentage of fibrosis was evaluated by morphometry, as described in Materials and Methods. Data were represented graphically as the mean  $\pm$ SEM of 5-8 mice per group. \*\* $P < 0.001$  compared to saline, \*\*\*  $P < 0.0001$  compared to saline.

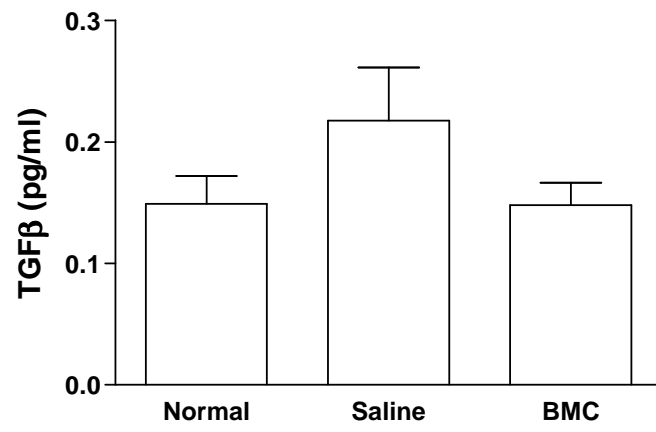




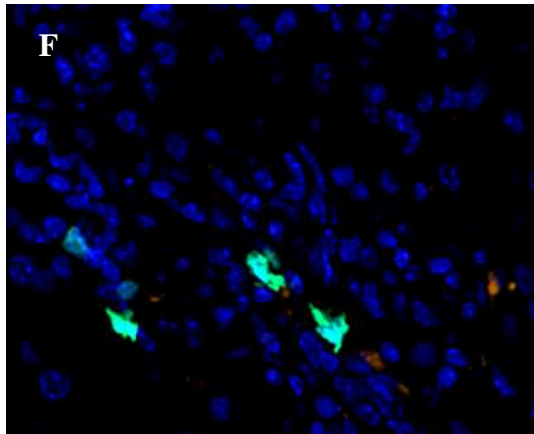
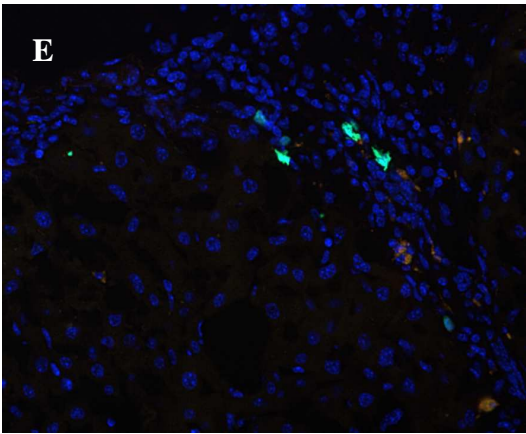
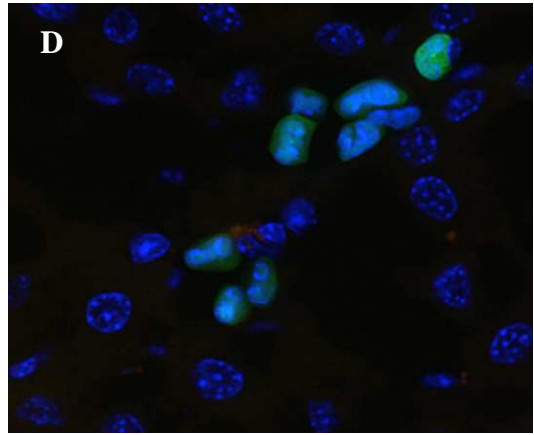
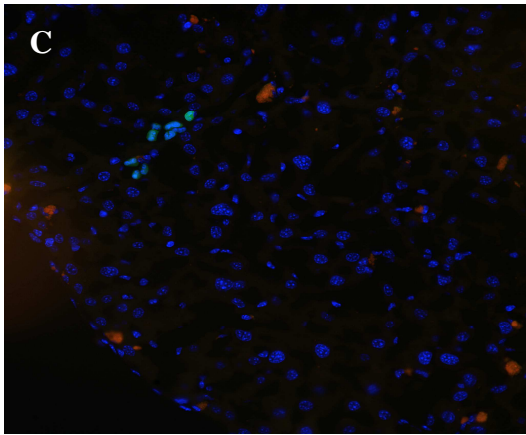
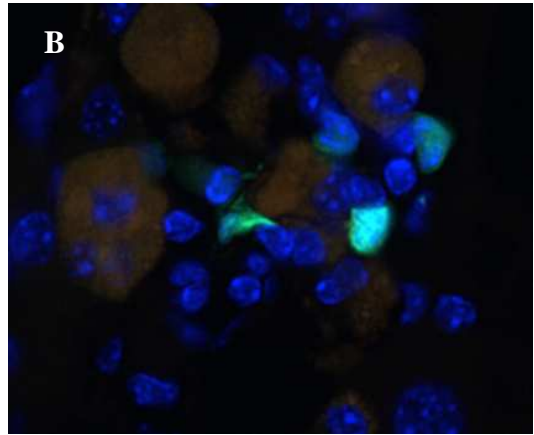
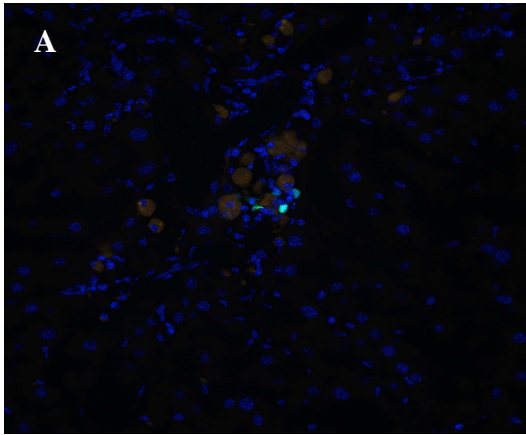
**Figure 2. Morphological aspects of liver sections by HE, Sirius red and fluorescence analyses.** Representative images of liver sections stained by Sirius red- Fast green showing a reduction in the amount of fibrosis in the group treated with BMC (B) when compared to the saline-treated group (A) after two months. Presence of enlarged cells similar to macrophages located in portal areas seen in HE (C) and showing autofluorescence (D). For visualization of GFP<sup>+</sup> cells (green), sections were mounted with the nuclear counterstaining with DAPI (blue). Oval cells stained with anti-OV6 (red) were seen surrounding autofluorescent cells (E).



**Figure 3. Assessment of TGF- $\beta$  levels in livers of mice submitted to BMC therapy.** TGF- $\beta$  levels were assessed in fragments of hepatic tissue of normal animals and saline or BMC-treated cirrhotic mice 2 months after therapy. Assessment was done by sandwich ELISA, as described in Materials and Methods. Data represents the means  $\pm$  SEM of 9 mice per group.



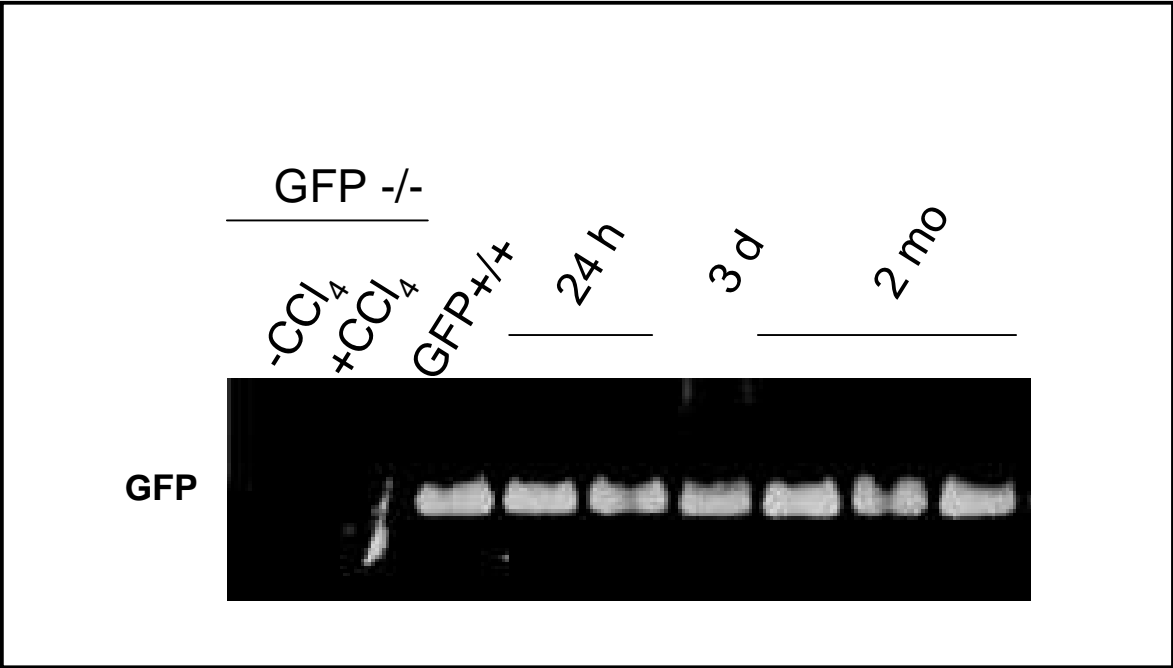
**Figure 4. BMC migrate to cirrhotic liver after transplantation.** Mice were treated with BMC therapy, and sacrificed after 1, 3 or 7 days for evaluation by fluorescence microscopy. For visualization of GFP<sup>+</sup> cells (green), sections were mounted using nuclear counterstaining with DAPI (blue). Small round-shaped GFP<sup>+</sup> cells were seen scattered in the liver parenchyma 1 (A and B) and 3 days (C and D) after transplantation. GFP<sup>+</sup> cells with elongated shapes were seen 6 days after transplantation (E and F).



**Figure 5. Presence of GFP DNA in liver fragments of normal and cirrhotic mice.**

Normal and CCl<sub>4</sub>-treated wild-type (GFP<sup>-/-</sup>) mice transplanted or not with GFP<sup>+</sup> BMC were sacrificed 24 h, 3 d or 2 months after BMC therapy. GFP-transgenic mice (GFP<sup>+/+</sup>) were used as positive controls. Liver fragments were obtained for DNA extraction and PCR amplification of GFP, as described in Materials and Methods.





***5 MANUSCRITO III***

---

**Treatment with bone marrow cells in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni***

Sheilla Andrade de Oliveira<sup>a,b</sup>, Bruno Solano de Freitas Souza<sup>a</sup>, Carla Adriana Guimarães-Ferreira<sup>a</sup>, Elton Sá Barreto<sup>a</sup>, Siane Campos de Souza<sup>a</sup>, Luiz Antonio Rodrigues de Freitas<sup>a</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>a,c</sup>, Milena Botelho Pereira Soares<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, 40295-001 Salvador, BA, Brazil.*

<sup>b</sup>*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Av Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil.*

<sup>c</sup>*Hospital São Rafael, Av São Rafael, 2152, São Marcos, 41256-900 Salvador, BA, Brazil.*

\*Corresponding author. Tel.: +55 71 31762260; fax. +55 71 31762292

E-mail address: [milena@cpqgm.fiocruz.br](mailto:milena@cpqgm.fiocruz.br) (M. B. P. Soares).

**Abstract**

Liver fibrosis is an important pathology of chronic infection by *Schistosoma mansoni*. The alterations caused by deposition of schistosome eggs in portal venules cause morbidity and mortality in schistosomiasis. Here we investigated the potential of bone marrow mononuclear cells in the regeneration of hepatic lesions induced by *S. mansoni* chronic infection. Female mice chronically infected with *S. mansoni* were treated with bone marrow mononuclear cells obtained from male GFP transgenic mice by endovenous or intralobular injections. Transplanted GFP<sup>+</sup> cells migrated to granuloma areas and reduced the percentage of liver fibrosis. The presence of donor-derived cells was confirmed by FISH analysis for detection of cells bearing Y chromosome and by PCR analysis for detection of GFP DNA. The levels of TGF- $\beta$ , a cytokine associated with fibrosis deposition, in liver fragments of mice submitted to therapy were reduced. The number of oval cells in liver sections of *S. mansoni*-infected mice increased 3-4 fold after transplantation. A partial recovery in albumin expression, which is decreased upon infection with *S. mansoni*, was found in livers of infected mice after cellular therapy. In conclusion, transplanted bone marrow cells migrate to and reduce the damage of chronic fibrotic liver lesions caused by *S. mansoni*.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; Liver injury; Fibrosis; Bone marrow cells; Transplantation; Albumin; Oval cells

## 1. Introduction

Chronic infection by *Schistosoma mansoni* is one of the experimental models of hepatic fibrosis used to elucidate the mechanisms involved in the fibrogenic processes. In schistosomiasis, the main immune-inflammatory response is directed against the parasite eggs, which, when led to portal circulation, may become lodged into hepatic portal venules, eliciting a granulomatous response. In the mouse model of schistosomiasis, the persistence of the stimulus leads to the development of two pathological patterns: isolated granulomas or periportal fibrosis, the latter resembling the pipe-stem fibrosis found in the severe hepatosplenic form of human disease [1].

Liver fibrosis occurs in the setting of chronic injury caused by different etiologies, constituting a serious worldwide public health problem. Whereas in acute hepatic injury nonviable cells are replaced by normal tissue, during chronic injuries a persistent repair response may lead in fibrosis and scar formation as a result of an imbalance between proliferation and degradation of the extracellular matrix components [2]. In addition to schistosomiasis, hepatopathies due to alcohol, viral hepatitis, drugs, metabolic and autoimmune diseases, and congenital abnormalities are important causes of liver fibrosis [2].

New therapeutic strategies aiming to minimize damages caused by hepatic fibrogenesis in chronic liver diseases are of great interest. Adult bone marrow contains pluripotent stem cells with the ability to differentiate into diverse cell types, including hepatocytes [3]. The regenerative potential of bone marrow stem cells has been tested in experimental models of hepatic injury, demonstrating the ability of bone marrow cells to generate hepatocytes under tissue stress in mice and human [4, 5]. In this context, regenerative medicine has emerged as an alternative therapy to improve damaged liver function [5-7].

In this report we used an experimental model of hepatic fibrogenesis caused by chronic infection with *S. mansoni* in order to evaluate the contribution of cellular therapy in hepatic diseases. We investigated the potential of syngeneic bone marrow mononuclear cells in the modulation of fibrosis, albumin expression and cellular alterations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Female or male C57Bl/6 wild-type and EGFP transgenic mice (4-6 weeks old) were used as recipients and as donors of bone marrow cells (BMC), respectively. All the animals weighting 20-23 g were raised and maintained at the Gonçalo Moniz Research Center/FIOCRUZ in rooms with controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) and continuous air renovation. Animals were housed in a 12 h light/12 h dark cycle (6 am - 6 pm) and provided with rodent diet and water *ad libitum*. Animals were handled according to the NIH guidelines for animal experimentation. All procedures described here had prior approval from the local animal ethics committee.

### 2.2. Infection with *Schistosoma mansoni*

C57Bl/6 mice were infected by transcutaneous route with 30 *S. mansoni* cercariae of the Feira de Santana strain [8]. This strain was maintained through successive passages in laboratory-raised *Biomphalaria glabrata*. Two weeks later the animals were exposed to reinfection with 15 cercariae. The infection was confirmed 40 days after the primary infection by parasitological exam of feces. Only mice presenting viable eggs in the stools were used. Four months after the primary infection, mice were treated with praziquantel (Farmanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) by gavage in a single dose of 400 mg/kg/w.

### *2.3. Transplantation of bone marrow cells*

Bone marrow cells (BMC) were obtained from femurs and tibiae of 4 to 6 week old C57Bl/6 EGFP transgenic mice. BMC were purified by centrifugation in Ficoll gradient at 1000 x g for 15 min (Histopaque 1119 and 1077, 1:1; Sigma, St. Louis, MO). After two washings in RPMI medium (Sigma), the mononuclear cell fraction was resuspended in saline, filtered over nylon wool and used for therapy. One group of mice received one administration of BMC ( $3 \times 10^7$  cells/mouse) directly into the left hepatic lobe. In the other experiments, mice were treated with BMC ( $1-3 \times 10^7$  cells/mouse) i.v. (by retroorbital plexus), once a week, during 3 weeks. Control mice received injections of saline in similar conditions to the respective experimental groups. Mice were submitted to euthanasia at different times after therapy, under anesthesia with ketamine and xylazine.

### *2.4. TGF- $\beta$ assessment*

TGF- $\beta$  levels were measured by ELISA in total protein of homogenized liver tissue (50 mg) in 100  $\mu$ l PBS containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20 and protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 20 KI aprotinin A/100 ml). The samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4° C and the supernatant was frozen at -80° C for later quantification. TGF- $\beta$  levels were measured using a sandwich ELISA assay following the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### *2.5. Morphological and morphometrical analyses*

Mice were perfused under anesthesia through the heart with 50 ml of PBS followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde at 4° C. Liver slices were fixed in Bouin or formalin at

10% and, after paraffin embedding, 5  $\mu\text{m}$ -thick sections were obtained and stained with conventional hematoxylin-eosin or with picosirius-red method for collagen [9]. Quantification of fibrosis was carried out in sections stained with picosirius-red examined by optical microscopy, in 10 fields per liver in 5-14 mice per group. Images were digitalized using a color digital video camera (CoolSnap, Montreal, Canada) adapted to a BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and analyzed using Image Pro program (version 6.1; Media Cybernetics, San Diego, CA). For morphometric measurements of granuloma area, a total sectional area of 723255  $\mu\text{m}^2$  per animal was evaluated. All periovular granulomas were included. Albumin granules and OV-6<sup>+</sup> cells were quantified in five liver sections of seven or five animals per group (normal, treated and untreated), respectively, by fluorescence microscopy (BX61 Olympus) and analyzed using Image Pro program. Albumin granules were automatically quantified and the number of hepatocytes was estimated manually by nuclear staining in order to determine the average number of albumin granules/cell. All the analyses were done double-blinded.

#### *2.6. Immunofluorescence analyses*

Five- $\mu\text{m}$  frozen sections obtained at various times after transplantation were prepared and fixed in 4% cold paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The presence of transplanted GFP<sup>+</sup> BMC in the liver tissue was analyzed by direct fluorescence. Oval cells were stained using a biotinylated anti-OV-6 antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) followed by streptavidin Alexa 568 (Molecular Probes, Carlsbad, CA). For albumin visualization and quantification, liver sections were stained using a rabbit anti-human albumin (DAKO, Glostrup, Denmark) followed by anti-rabbit IgG conjugated with Alexa fluor 568 (Molecular Probes). Nuclei were stained with 4,6-dismidino-2-phenylindole (VectaShield Hard Set mounting medium with DAPI H-1500; Vector Laboratories,



Burlingame, CA). The presence of fluorescent cells was determined by observation in a BX61 microscope with epifluorescence system plus grid to enhance the fluorescence resolution (Optigrid, Structured- light Imaging System, Thales Optem inc, Fairport, NY) using appropriate filters (Olympus). Images were captured using a color digital video SPOT flex camera (15.2, 64 Mp, Shifting Pixel, Diagnostic Instruments inc, Sterling Heights, MI).

### 2.7. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in paraffin-embedded tissue sections

Liver sections 3–6  $\mu\text{m}$ -thick were prepared on glass slides and dried overnight at 37° C. After dewaxing in xylene and rehydration, sections were incubated with sodium thiocyanate solution for 10 min at 80° C, washed in PBS followed by incubation with pepsin solution for 10 min at 37° C. Sections were washed in PBS, post-fixed in paraformaldehyde solution for 2 min, washed in PBS, and dehydrated through graded alcohols before air drying. Detection of Y chromosome was done using Y-paint probe kit (Cambio, Cambridge, UK), according to the manufacturer's instructions. Slides were mounted with coverslips using Vectashield mounting set with DAPI (Vector), and analyzed by fluorescence microscopy.

### 2.8. Polymerase chain reaction (PCR) for GFP

The presence of donor-derived DNA in liver tissue was analyzed 2 months after BMC transplantation in *S. mansoni*-infected mice. DNA was extracted from liver tissue using a DNA extraction kit (QIAamp® DNA Mini Kit -50, Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA samples concentration was quantified in 1  $\mu\text{l}$  in a spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). All samples were diluted to 100-200 ng/ $\mu\text{l}$ . PCR amplification of GFP cDNA was

performed using Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) using standard procedures and the following primers pair (Invitrogen): forward, 5' CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G 3', reverse, 5' CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G 3'.

### 2.9. Statistical analyses

Data were analyzed using Student's *t*-test, Mann Whitney, ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test with the aid of Prism Software (version 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Differences were considered significant if *P* was equal to or less than 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Transplanted GFP<sup>+</sup> BMC are found in livers of *S. mansoni*-infected mice

Mice chronically infected with *S. mansoni* were treated with GFP<sup>+</sup> mononuclear BMC by injection into the left hepatic lobe. Liver sections were obtained at different times after transplantation. Bright GFP<sup>+</sup> cells were found around periovular granulomas, in the injected lobe, 2 h after cell infusion (Fig. 1A-C). GFP<sup>+</sup> cells had different shapes and size within the parenchyma (Fig. 1B and C). After 24 h of injection, GFP<sup>+</sup> cells were also found inside granulomas in sections of injected (Fig. 1D) as well as in non-injected lobes (not shown). Five days after transplantation, elongated, spindle shape GFP<sup>+</sup> cells were mainly found inside granuloma areas (Fig. 1E and F). Bright GFP<sup>+</sup> cells were not found in sections of BMC-treated mice 1 month after transplantation by endovenous route, although faint fluorescent hepatocyte-like cells are found in the hepatic parenchyma at this later timepoint (Fig. 1G). The presence of donor-derived hepatocyte-like cells was confirmed by detection of Y-chromosome by FISH analysis in parenchymatous cells in liver sections of BMC-

treated mice 1 month after therapy (Fig. 1H). Furthermore, the presence of GFP DNA was detected by PCR in liver samples of BMC-treated mice 2 months after therapy (Fig. 2).

### 3.2. Therapy with BMC reduces liver fibrosis induced by *S. mansoni* infection

Liver sections of *S. mansoni*-infected mice treated with BMC were analyzed, showing a granulomatous inflammatory process in all groups, treated or untreated, with periportal granulomas well delimited and homogeneous in shape and cellular infiltrate with predominance of mononuclear cells and with regular and concentric deposits of collagen fibers (Fig. 3A-D). After treatment with BMC, we observed a trend of fibrosis reduction (Fig. 3B and D), compared to saline-treated animals (Fig. 3A and C). In animals treated by intralobular injection of BMC, a statistically significant reduction of fibrosis was observed in treated lobes two months after treatment (Fig. 4A). In addition, a reduction of fibrosis was also found in sections of untreated lobes (% of fibrosis in untreated lobes:  $14.1 \pm 0.7$  compared to livers of saline-treated mice:  $17.9 \pm 0.7$ ;  $P < 0.001$ ). Fibrosis reduction was also observed when BMC were injected by endovenous route 2 months after cell infusion (Fig. 4B). Morphometric evaluation of granuloma area showed a significant reduction after therapy in animals treated with BMC by intrahepatic (Fig. 4C) as well as by endovenous route (Fig. 4D).

TGF- $\beta$  levels in liver fragments were assessed 2 months after BMC therapy by endovenous route. A significant decrease of TGF- $\beta$  levels was observed in livers of BMC-treated mice compared to saline-treated *S. mansoni*-infected mice. The levels of TGF- $\beta$  in BMC-treated mice were similar to those of normal mice (Fig. 5A).

### 3.3. Increase in oval cell numbers after BMC transplantation in *S. mansoni*-infected mice

The presence of oval cells in liver sections of normal, *S. mansoni*-infected mice treated or not with BMC was evaluated by immunofluorescence using an anti-OV-6 antibody. Sections of normal livers had none or few OV-6<sup>+</sup> cells (Fig. 5B). Infection with *S. mansoni* caused an increase in the number of OV-6<sup>+</sup> cells, which were mainly found in zone 1 areas of the hepatic lobe in saline-treated (Fig. 1I), as well as in BMC-treated animals (Fig. 1J) 2 months after endovenous route. The number of OV-6<sup>+</sup> cells, however, was 3-4 times higher in sections of BMC-treated mice (Fig. 5B;  $P=0.0027$ ).

#### 3.4. BMC treatment increases albumin production in *S. mansoni*-infected mice

Immunostaining for albumin in liver sections of mice chronically infected with *S. mansoni* showed an abnormal pattern of albumin expression. A bright intracytoplasmic granular staining is found in sections of uninfected mice (Fig. 3E), whereas liver sections of untreated *S. mansoni*-infected mice had few and abnormal albumin granules, preferentially located in the periphery of hepatocytes (Fig. 3F). Liver sections of BMC-treated mice also had an altered albumin staining pattern, although more intense than untreated mice (Fig. 3G). When the number of albumin<sup>+</sup> granules was evaluated, a significant difference between uninfected and infected mice was found, showing a 3-fold higher number of granules in normal mice compared to saline-treated infected mice (Fig. 5C;  $P<0.001$ ). BMC therapy caused a significant increase in the number of granules, compared to saline-treated, *S. mansoni*-infected mice ( $P<0.05$ ), although the levels were still below those of normal livers (Fig. 5C;  $P<0.001$ ).

## 4. Discussion

Cellular therapy for liver regeneration has been intensively investigated mainly in models of hepatic diseases caused by drug administration, surgical interventions and by

genetic disorders [10-13]. A number of reports have demonstrated that transplantation of bone marrow cells improves liver function, decreases fibrosis and contributes to parenchyma regeneration [11, 14-15]. In this report we describe, for the first time, the effects of bone marrow cell therapy in a model of chronic liver disease caused by a parasitic infection.

The recruitment of bone marrow cells to liver lesions has been well documented in several models of liver diseases [10-12, 14]. In our study we also found that liver injury caused by *S. mansoni* infection elicits the migration of bone marrow cells, which were able to reach the granuloma areas. Many of the cells observed in the liver sections are probably leukocytes (found in the mononuclear cell fraction used in the cellular therapy), that are chemoattracted by the intense inflammatory reaction around periovular granulomas. Most GFP<sup>+</sup> cells that migrated inside the granulomas, however, are larger than leukocytes and could be spindle-shaped like fibroblasts or myofibroblasts. Both of these cells are well known to participate in the fibrogenesis associated with *S. mansoni* infection and also to take part in collagen degradation during fibrosis modulation [16-18]. The differentiation of bone marrow cells into myofibroblasts and/or fibroblasts may be an important step in the modulation of fibrosis observed in the present study. Recently, it has been shown that a significant number of myofibroblasts in human hepatic fibrosis are of bone marrow origin [19].

In latter time points, hepatocyte-like cells expressing weak GFP fluorescence were observed. The presence of transplanted BMC-derived parenchymatous cells was confirmed by observation of donor DNA by PCR analysis (for detection of GFP DNA) and FISH (for detection of Y chromosomes in nuclei). These results reinforce a contribution of bone marrow cells in the reconstitution of liver parenchyma, as described before in other models of liver diseases [20, 21]. In our study, we found few hepatocyte-like cells bearing Y

chromosome (1-2 cells/section). In addition, we did not find binucleated cells with Y chromosome in one nucleus. Although we cannot rule out that fusion of transplanted BMC with resident hepatocytes occurs, these findings indicate that the few hepatocyte-like cells derived from transplanted BMC observed in our model are generated by transdifferentiation. In addition to the population of stem cells, the potential of transdifferentiation into hepatocytes has been recently extended to another cell type present in the bone marrow, the monocytes [22]. Thus, it is possible that more than one cell type present in the cell preparation used in our study take part in the generation of hepatocyte-like cells. It is also likely that the transplanted cells take part in the immune regulation of the liver [23], causing the modulation of fibrosis, cytokine production and albumin synthesis observed in our study.

Fibrosis is a common feature of chronic liver diseases. The increased deposition of extracellular matrix causes structural alterations in the liver and in its function, and portal hypertension due to the obstruction of vessels and focal ischemic lesions. Although spontaneous regression of fibrosis occurs when the stimulus for hepatic liver damage is removed, in diseases such as viral hepatitis the stimulus cannot be completely removed, in addition to being a slow process [24]. Therefore, means to decrease liver fibrosis are extremely relevant to improve liver function and to decrease complications related to chronic hepatopathies. In this regard, schistosomiasis is an interesting model of chronic fibrotic liver disease. In our study we observed a significant decrease of liver fibrosis after cellular therapy, as demonstrated by morphometrical analysis of granuloma area and total liver fibrosis. This was achieved both by intralobular administration as well as by endovenous injection, indicating that fibrosis does not hamper the influx of cells to the liver of *S. mansoni*-infected mice. In a recent report, Higashiyama et al (2007) demonstrated that bone marrow-derived cells which migrated to fibrotic livers express matrix

metalloproteinases. Thus, the transplanted cells found in the hepatic parenchyma of *S. mansoni*-infected mice may be acting directly to increase the degradation of extracellular matrix components.

One of the main mediators involved on fibrosis deposition during hepatic injury is TGF- $\beta$  [25]. This cytokine stimulates the transition of stellate cells to myofibroblasts, which secrete high amounts of extracellular matrix and inhibit its degradation [26]. TGF- $\beta$  levels were lowered after BMC therapy in livers of *S. mansoni*-infected mice, reaching levels close to those found in normal mice. A decrease in TGF- $\beta$  production was also observed by Fang et al (2004) after therapy using bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice with liver injury caused by CCl<sub>4</sub> administration.

Oval cells are hepatic precursors of hepatocytes and bile duct cells [27]. An increase of oval cell numbers was found in liver sections of *S. mansoni*-infected mice, compared to those of normal mice. Transplantation of BMC, however, caused a 3-4 fold increase on oval cell numbers in infected mice. This may be explained by the fact that oval cells can be originated from bone marrow cells [4]. Alternatively, the effects of BMC injection on oval cell numbers may be due to their migration to and action in other organs, such as the bone marrow. It is possible that the increase in oval cells contribute to the replacement of areas where fibrosis degradation occurs with functional parenchymatous cells after BMC therapy.

Although a study by Cook et al (1974) has reported hypoalbuminemia in *S. mansoni*-infected children, most infected individuals have normal serum albumin levels. In contrast, chronic infection with *S. mansoni* causes hypoalbuminemia in mice [29]. In our study we also observed a marked alteration of albumin expression in hepatocytes of infected mice, compared to normal controls. BMC therapy significantly increased the expression of albumin in livers of *S. mansoni*-infected mice, although the pattern was still

altered in comparison to that of normal livers. An increase in albumin levels was also found after cell therapy in a model of CCl<sub>4</sub>-induced lesion in rats [30].

In conclusion, transplantation of bone marrow cells in mice with chronic liver disease caused by *S. mansoni* infection decreased liver fibrosis and contributed to an increase in precursor cells as well as to the generation of new hepatocytes and/or to the improvement of the function of resident hepatocytes. Although there are still many unanswered questions regarding the mechanisms of action of transplanted cells in hepatic lesions, our results reinforce the use of cell-based therapies for patients with chronic liver diseases.

## **5. Acknowledgements**

The authors thank Carine Machado Azevedo and Juliana F. Vasconcelos for technical assistance. This work was supported by IMBT (CNPq/MCT), RENORBIO, FAPESB and FIOCRUZ.



**References**

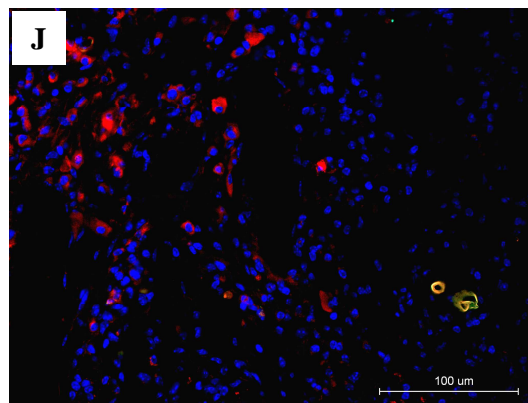
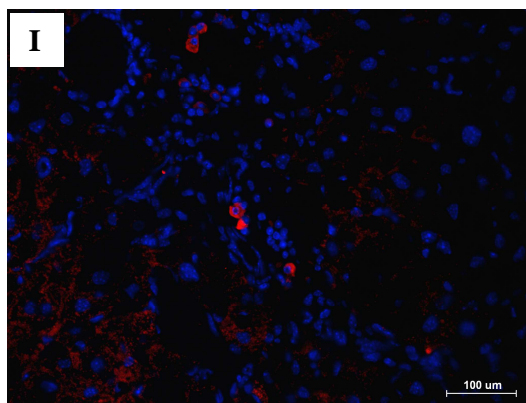
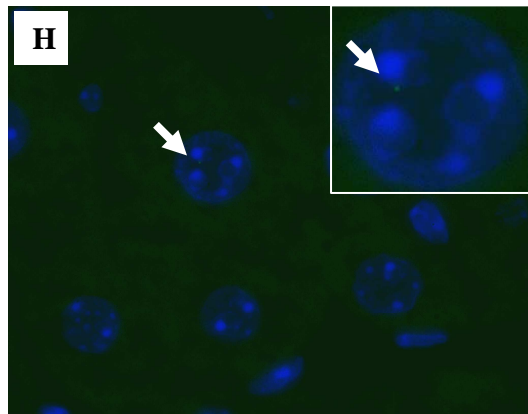
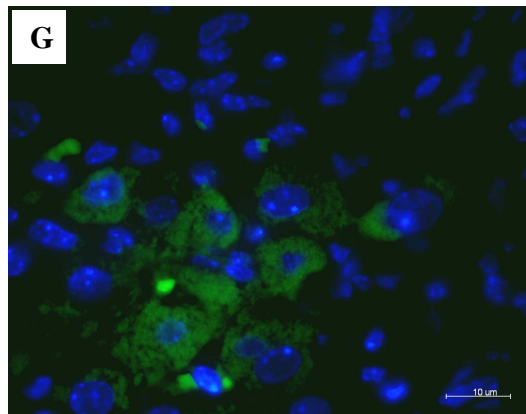
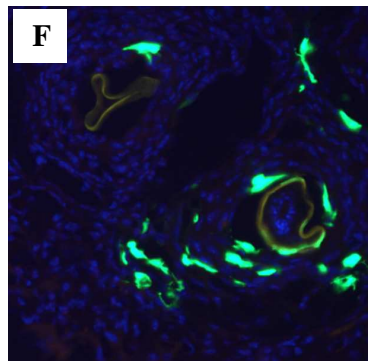
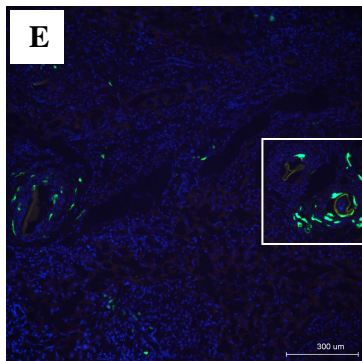
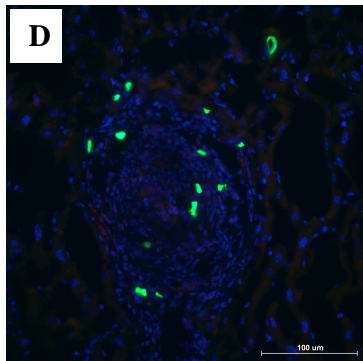
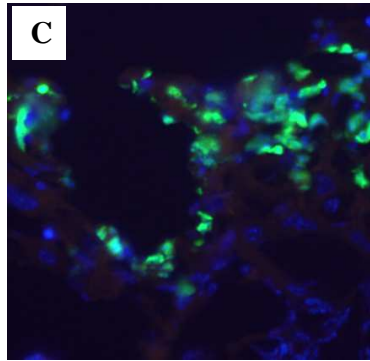
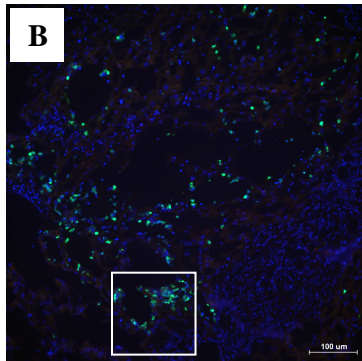
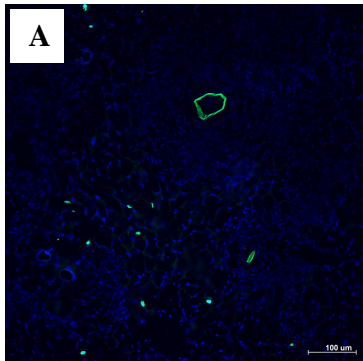
- [1] Andrade ZA, Cheever AW. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ('pipestem' fibrosis). *Int J Exp Pathol* 74 (1993) 195-202.
- [2] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115 (2005) 209-218.
- [3] Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105 (2001) 369-377.
- [4] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284 (1999) 1168-1170.
- [5] Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406 (2000) 257.
- [6] Braun KM, Sandgren EP. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. *Am J Pathol* 157 (2000) 561-569.
- [7] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6 (2000) 1229-1234.
- [8] Andrade ZA, Sadigursky M. A comparative study of the Feira de Santana (Bahia) and Porto Rico strains of *Schistosoma mansoni* in experimental infection of mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80 (1985) 37-40.
- [9] Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR.: Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11 (1979) 447-455.

- [10] Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion: *Nat Cell Biol* 6 (2004) 532-539.
- [11] Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 (2004) 1304-1311.
- [12] Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 36 (2002) 653-659.
- [13] Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut* 56 (2007) 716-724.
- [14] Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 78 (2004) 83-88.
- [15] Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 11 (2005) 3431-3440.
- [16] de Freitas LA, Chevallier M, Louis D, Grimaud JA. Human extrahepatic biliary atresia: portal connective tissue activation related to ductular proliferation. *Liver* 6 (1986) 253-261.
- [17] Grimaud JA, Borojevic R. Portal fibrosis: intrahepatic portal vein pathology in chronic human *Schistosomiasis mansoni*. *J.Submicrosc. Cytol* 18 (1986) 783-793.
- [18] de Freitas LA, Grimaud JA, Chevallier M, Andrade ZA. Morphological aspects of early and late collagen degradation in granulation tissue. *Exp Toxicol Pathol* 44 (1992) 128-133.

- [19] Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 126 (2004) 955-963.
- [20] Kashofer K, Siapati EK, Bonnet D. In vivo formation of unstable heterokaryons after liver damage and hematopoietic stem cell/progenitor transplantation. *Stem Cells* 24 (2006) 1104-1112.
- [21] Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45 (2007) 213-222.
- [22] Yan L Han Y, Wang J, Liu J, Hong L, Fan D. Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes. *Am J Hematol* (2007) *in press*.
- [23] Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Bio* 84 (2006) 413-421.
- [24] Kumar M, Sarin SK. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian Journal of pediatrics* 74 (2007) 393-399.
- [25] Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7 (2002) 793-807.
- [26] Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 54 (1996) 39-45.
- [27] Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120 (2003) 117-130.

- [28] Cook JA, Baker ST, Warren KS, Jordan P. A controlled study of morbidity of schistosomiasis mansoni in St. Lucian children, based on quantitative egg excretion. *Am J Trop Med Hyg* 23 (1974) 625-633.
- [29] Saber MA, Shafritz DA, Zern MA. Changes in collagen and albumin mRNA in liver tissue of mice infected with *Schistosoma mansoni* as determined by in situ hybridization. *J Cell Biol* 97 (1983) 986-992.
- [30] Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. *J. Hepatol* 44 (2006) 742-748.

**Fig. 1. Visualization of donor-derived cells and OV-6+ cells in liver sections of *S. mansoni*-infected mice.** Mice chronically infected with *S. mansoni* were treated with GFP<sup>+</sup> BMC directly into the left hepatic lobe (**A-F**) or by endovenous route (**G** and **H**) and sacrificed after different time points for evaluation by fluorescence microscopy. For visualization of GFP<sup>+</sup> cells (green), sections were mounted with the nuclear counterstaining with DAPI (blue). **A** and **B**, sections of injected lobe of mice sacrificed 2 h after transplantation. **C**, Magnification of square area in image **B**. Sections of livers obtained from mice sacrificed 24 h (**D**) or 5 days (**E**) after BMC injection into the hepatic lobe. **F**, Magnification of square area in image **E**. **G**, GFP<sup>+</sup> hepatocyte-like cells found in liver sections 1 month after endovenous injection of BMC. **H**, Detection of Y chromosome (arrow) in liver section of BMC-treated mice 1 month after transplantation by endovenous route. Oval cells (OV-6<sup>+</sup> stained in red) in sections of saline (**I**) or BMC (**J**) treated mice 2 months after transplantation by endovenous route.



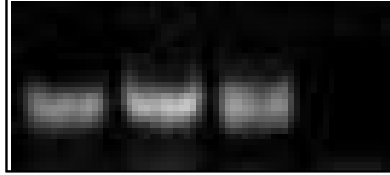
**Fig. 2. Detection of donor cell DNA in livers of BMC-transplanted mice.** *S. mansoni*-infected mice treated with BMC by endovenous route were sacrificed 2 months after therapy. Liver fragments were used for DNA extraction and PCR amplification of GFP gene. Liver fragments of normal wild-type and GFP mice were used as controls.

GFP+

*S.mansoni*

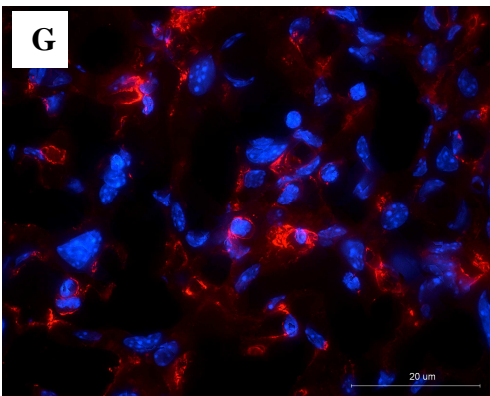
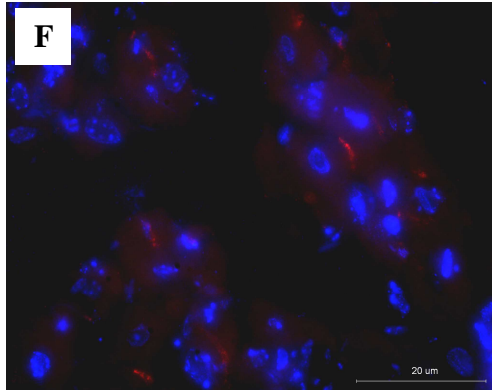
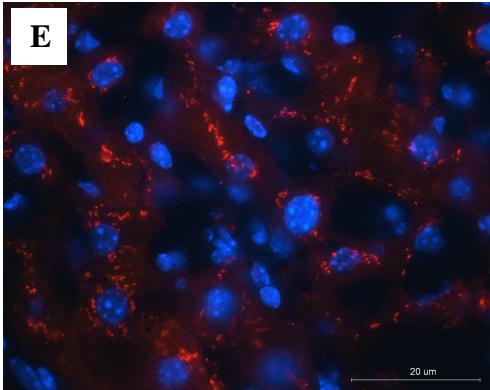
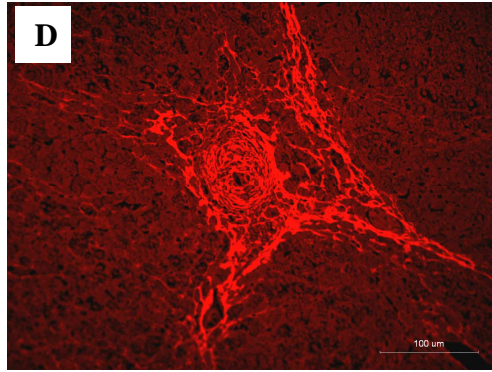
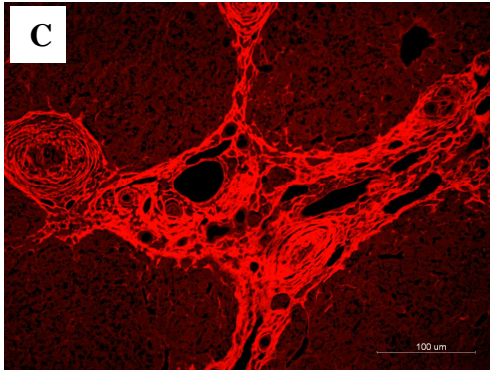
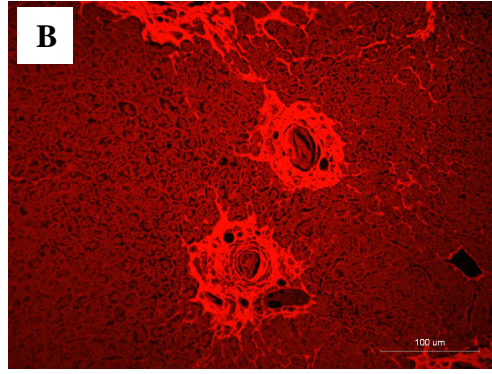
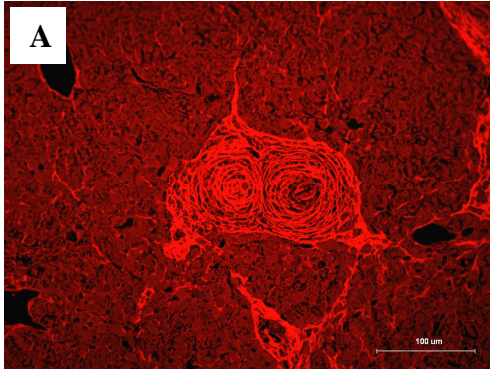
*S.mansoni*

Normal

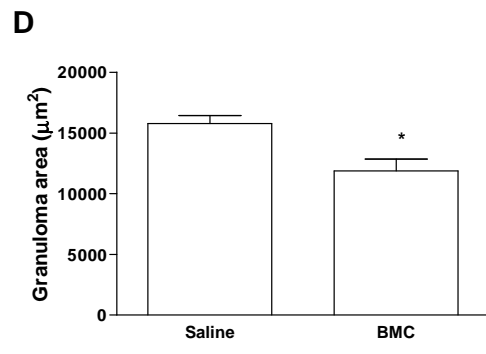
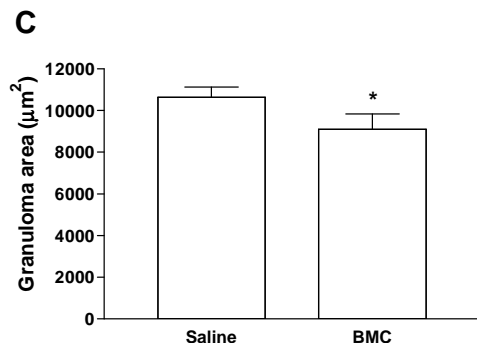
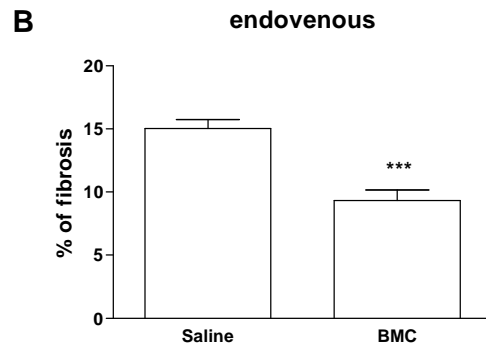
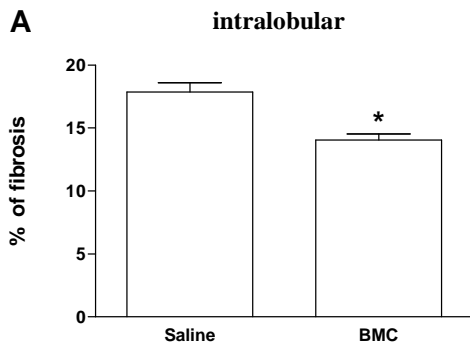




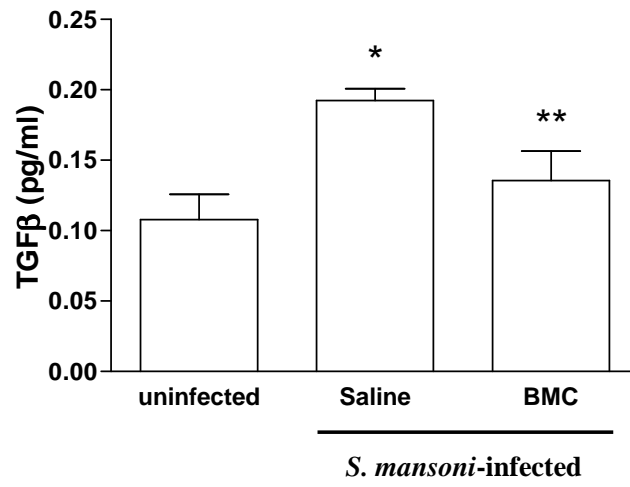
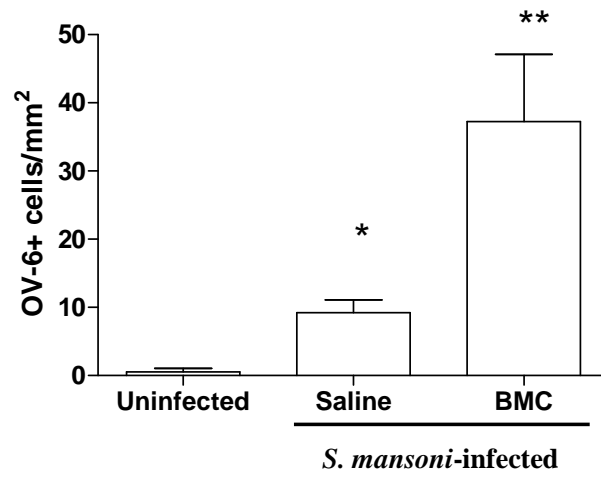
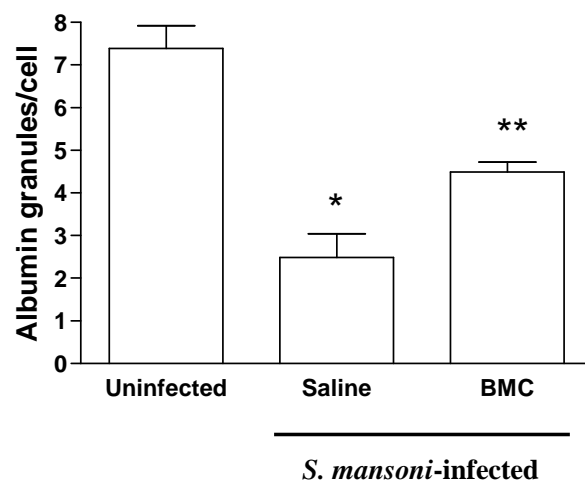
**Fig. 3. Morphological aspects of liver sections by fluorescence analyses.** Representative images of liver sections stained by Sirius red-Fast green of *S. mansoni*-infected mice 2 months after saline (**A-C**) or BMC (**B-D**) treatment by endovenous route. Albumin (red) and nuclei (blue) staining in sections of uninfected (**E**), saline-treated (**F**) or BMC-treated (**G**), *S. mansoni*-infected mice, 2 months after treatment by endovenous route.



**Fig. 4. Reduction of fibrosis and granuloma area after BMC therapy.** Mice infected with *S. mansoni* and treated with saline or BMC by intralobular (**A** and **C**) or endovenous (**B** and **D**) routes were sacrificed 2 months after treatment. Liver sections sampled randomly and stained with Sirius red-Fast green were examined by optical microscopy. Images were digitalized and analyzed by morphometry. The percentage of fibrosis (**A** and **B**) and the area of periovular granulomas (**C** and **D**) were evaluated. Data were represented graphically as mean  $\pm$ SEM of 5-14 animals per group (\* $P$ <0.05).



**Fig. 5. BMC therapy alters the levels of TGF- $\beta$  and albumin and the number of oval cells in livers of *S. mansoni*-infected mice.** **A**, TGF- $\beta$  levels were assessed in fragments of hepatic tissue of uninfected, saline-treated or BMC-treated *S. mansoni*-infected mice 2 months after cellular infusion by endovenous route, by sandwich ELISA. Data represents the mean  $\pm$  SEM of 4-8 animals per group. **B**, The number of oval cells in liver sections of uninfected, saline-treated or BMC-treated *S. mansoni*-infected mice 2 months after cellular infusion by endovenous route was determined by immunofluorescence analysis using an anti-OV-6 antibody. Data represents the means  $\pm$ SEM of 5-6 animals per group. **C**, Albumin<sup>+</sup> granules were quantified by morphometry in liver sections of uninfected, saline-treated or BMC-treated *S. mansoni*-infected mice 2 months after cellular infusion by endovenous route. Data represents the mean  $\pm$ SEM of 7 animals per group. \*  $P < 0.05$  compared to uninfected; \*\*  $P < 0.05$  compared to saline-treated.

**A****B****C**

## **6. DISCUSSÃO**

---

Em seres humanos as doenças crônicas parenquimatosas do fígado (DCPF) são decorrentes de diversas causas, incluindo agentes infecciosos, hepatotóxicos e fatores genéticos (CORRAO E ARICO, 1998; KEEFFE, 2001). As doenças do fígado podem causar a evolução para a insuficiência hepática, onde o tratamento disponível mais eficaz é o transplante de fígado. A insuficiência hepática resultante de lesões agudas ao fígado é rara, enquanto que esta é bem comum em pacientes cirróticos. Em casos de insuficiência hepática, o desenvolvimento de terapias capazes de diminuir as lesões do fígado e melhorar o funcionamento deste órgão poderá ter um grande impacto na saúde pública, uma vez que, em países como o Brasil, não se consegue atender à demanda de transplantes de fígado.

Descobertas realizadas através de pesquisas com células-tronco têm estimulado estudos em terapias para lesões hepáticas. Embora alguns protocolos clínicos de terapia celular em pacientes com hepatopatias já tenham sido investigados (AM ESCH *et al.*, 2005; GORDON *et al.*, 2006; LYRA *et al.*, 2007; TERAJ *et al.*, 2006), a maior parte dos estudos utilizando terapia celular foi realizada em animais de experimentação. Ratos e camundongos têm sido os principais modelos utilizados nos estudos que visam estabelecer novos protocolos terapêuticos e descobrir os mecanismos que levam à melhora tecidual após a terapia com células-tronco (FANG *et al.*, 2004; LAGASSE *et al.*, 2000; OYAGI *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2005). Apesar das importantes descobertas já feitas em estudos experimentais, observamos que a maioria das avaliações foi realizada em modelos de lesões agudas do fígado. Levando-se em consideração que o modelo experimental se faz valer pela capacidade deste em representar o mais próximo possível o fenômeno que ocorre em seres humanos, é de grande importância a realização de

estudos em modelos de doenças hepáticas crônicas, não apenas para determinar quais os eventos e fatores estão relacionados à melhora tecidual após a terapia celular, mas também para o aperfeiçoamento dos protocolos terapêuticos.

Neste sentido, caracterizamos inicialmente um modelo de cirrose em camundongos C57Bl/6 para analisar a contribuição das células mononucleares de medula óssea nas lesões do fígado. A cirrose hepática não é apenas o estágio final da cicatrização hepática. É um processo dinâmico que apresenta alterações vasculares, nódulos regenerativos com a presença de necrose coagulativa, apoptose, esteatose, balonização de hepatócitos, alterações de citoesqueleto das células hepáticas e fibrose septal completa. (MAC SWEEN *et al*, 1987; SHALM, 1997). Deste modo, um modelo em camundongos da linhagem C57Bl/6, que apresente as alterações morfológicas características de cirrose, é de grande utilidade, pois permite a utilização de camundongos transgênicos e knockouts, geralmente disponíveis neste *background* genético, como receptores ou doadores de células-tronco.

O CCl<sub>4</sub> tem sido muito utilizado na indução experimental de lesões hepáticas, que servem como modelos para elucidar os mecanismos de hepatotoxicidade (PLAA, 2000). A produção de fibrose ou a cirrose pelo uso do CCl<sub>4</sub> têm sido analisadas em diversos estudos em roedores. Estes estudos têm demonstrado que, independente da espécie do animal ou da rota de indução de lesão no fígado pelo uso do CCl<sub>4</sub>, a cirrose experimental é resultante da administração de doses repetidas da droga em intervalos curtos de tempo e por períodos prolongados (TAMAYO, 1983). Em contraste com outros agentes carcinogênicos, o CCl<sub>4</sub> persiste no organismo por um curto período de tempo (provavelmente não mais do que 24 a 30 horas). Isto demonstra a necessidade de uma administração intermitente do CCl<sub>4</sub> na formação de cirrose e, conseqüentemente, de hepatocarcinoma (ESCHENBRENNER & MILLER, 1945).



Rosa e colaboradores (1991) realizaram um estudo controlado de cirrose hepática em ratos, os quais desenvolvem um quadro característico de cirrose após 16 semanas de administração da droga. Em nosso estudo, a dose utilizada em ratos não foi capaz de induzir a mesma lesão em camundongos quando administrada por igual período de tempo (dados não mostrados). Chang e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos tratados com CCl<sub>4</sub> apresentavam alta mortalidade mesmo não desenvolvendo cirrose, e que, de uma forma variável, os animais apresentavam cirrose entre 4 e 20 semanas de administração do CCl<sub>4</sub>. Nossos achados mostraram que os animais tratados com CCl<sub>4</sub> desenvolveram cirrose de forma variável só até a 24<sup>a</sup> semana, quando todos os animais avaliados desenvolveram cirrose com aspectos semelhantes às alterações sofridas em fígados de humanos.

Apesar de desenvolver um quadro morfológico característico de cirrose, nenhum dos nossos animais apresentou um quadro de descompensação bioquímica hepática, pelo menos quanto aos parâmetros analisados. Recentemente, Yokoyama e colaboradores (2006) observou, através de análise por proteoma, alterações sorológicas em camundongos intoxicados com CCl<sub>4</sub> e tratados com células de medula óssea, em comparação com animais controles. Isto sugere que, em nosso modelo, pode haver também alterações bioquímicas que não foram analisadas.

A interação direta dos metabólitos gerados pelo CCl<sub>4</sub> com o álcool não acelerou o desenvolvimento da cirrose hepática. No entanto, os animais tratados com esta associação apresentaram um índice maior de deposição de tecido fibroso, mostrando ser este modelo importante nos estudos que visam avaliar os fatores que levam à fibrogênese hepática. Estes resultados diferem dos achados de Bosma e colaboradores (1988), que excluem o uso do CCl<sub>4</sub> associado ao etanol como causa do aumento do aumento de tecido fibroso.

Em nossos estudos utilizamos como método de quantificação de fibrose a morfometria em cortes de fígado corados com picrossírius vermelho. Embora vários autores utilizem a quantificação de hidroxiprolina, um método bioquímico colorimétrico, para a quantificação de fibrose, este apresenta alta variabilidade e baixa reprodutibilidade, sobretudo para análise de fígados fibróticos (GOMES *et al.*, 2006). Em nossos estudos, as análises morfométricas realizadas foram feitas de modo duplo-cego, evitando assim subjetividade nas avaliações.

A utilização de terapia celular em doenças hepáticas vem sendo bastante estudada. Diversos trabalhos têm demonstrado que o tratamento com células-tronco contribui para a regeneração tecidual, causa a melhora das funções hepáticas e diminui a fibrose em modelos experimentais, principalmente em modelos de hepatopatias agudas (FANG *et al.*, 2004; HUSSAIN *et al.*, 2005; SAKAIDA *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram que a terapia com células mononucleares de medula óssea em camundongos diminuiu o percentual de tecido fibroso, tanto nos animais cirróticos estimulados com CCl<sub>4</sub> quanto nos animais esquistosomóticos crônicos.

A redução do tecido fibroso após a terapia com células-tronco de medula óssea já foi descrita em modelo de lesão hepática induzida por 1-3 meses de administração de CCl<sub>4</sub> (HIGASHIYAMA *et al.*, 2007; SAKAIDA *et al.*, 2004; TERAJ *et al.*, 2005). Sakaida e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos estimulados continuamente com CCl<sub>4</sub> e submetidos a terapia com células-tronco não só apresentaram redução do tecido fibroso como também um significativo aumento na sobrevida dos animais, quando comparados aos grupos controles. Terai e colaboradores (2005) sugeriram que a persistência do estímulo com o CCl<sub>4</sub> é necessária para a diferenciação das células-tronco em hepatócitos. Já Fang e colaboradores (2004) demonstraram que a terapia tem que ser realizada em uma fase inicial da lesão. Todavia, nossos resultados demonstraram que a

terapia celular foi eficiente em diminuir o tecido fibroso em lesões crônicas, e mesmo após a retirada do estímulo, nos dois modelos estudados.

Além das células mononucleares de medula óssea, outros tipos de células-tronco têm sido utilizados nos estudos experimentais de regeneração hepática. Estudos com células mesenquimais derivadas da medula óssea em modelo de lesão hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub> têm demonstrado resultados semelhantes aos obtidos com células mononucleares de medula óssea, tanto em camundongos (FANG *et al.*, 2004) quanto em ratos (ZHAO *et al.*, 2005), e indicam que a infusão de células-tronco mesenquimais inibe não apenas a deposição de fibrose, mas também a sua progressão (ZHAO *et al.*, 2005). Estamos desenvolvendo novos estudos comparando o potencial terapêutico das células mononucleares com o das células mesenquimais de medula óssea. As células mesenquimais já estão sendo utilizadas em estudos clínicos de fase I (VILQUIN & ROSSET, 2006; LE BLANK *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006; KATRITSIS *et al.*, 2005; FALANGA *et al.*, 2007). Portanto, caso seja demonstrado que seu efeito terapêutico em lesões hepáticas é maior que o de células mononucleares de medula óssea será possível a realização de estudos clínicos em pacientes com hepatopatias crônicas em um curto espaço de tempo.

Embora as células-tronco embrionárias possam se diferenciar em hepatócitos (CHINZEI *et al.*, 2002) as pesquisas com esse tipo de células ainda é incipiente, principalmente para uso terapêutico em pacientes devido a efeitos adversos como a formação de teratocarcinoma (CHINZEI *et al.*, 2002). Células sanguíneas do cordão umbilical também representam uma fonte rica de células hematopoéticas e mesenquimais. Tang e colaboradores (2003) e Di Campli e colaboradores (2004) têm investigado o papel dessas células em modelos experimentais de lesão hepática,



observando que a terapia com esta fonte celular causa a melhora na função hepática e aumento na sobrevivência destes animais, em relação aos controles não-tratados.

Os achados obtidos por nosso grupo com a terapia de células mononucleares de medula óssea em modelo de doença crônica do fígado são importantes do ponto de vista clínico, uma vez que a maior parte dos pacientes que são alvos em potencial da terapia celular apresenta doenças em estágios avançados. Vale chamar a atenção para o fato do transplante de células de medula óssea ser um procedimento já bem estabelecido na prática médica para o tratamento de doenças oncológicas e hematológicas. Além disso, estas células podem ser retiradas do próprio indivíduo (transplante autólogo, sem causar problemas relacionados à histocompatibilidade), separadas e infundidas sem a necessidade de permanecer em cultura, constituindo-se, assim, em uma fonte acessível para transplante.

Embora um grande número de observações, incluindo as nossas, apontem para uma ação antifibrosante das células-tronco, alguns autores têm discutido que a infusão dessas células contribui funcionalmente e significativamente para a geração de fibrose hepática (KISSELEVA *et al.*, 2006; RUSSO *et al.*, 2006). Nestes trabalhos, os autores verificaram que animais tratados com células de medula óssea apresentavam um número elevado de células estreladas e de miofibroblastos, que são células que participam do processo fibrogênico. É válido atentar para a necessidade de realização de estudos mais acurados a esse respeito, uma vez que as mesmas células que geram os estímulos necessários à síntese do colágeno são responsáveis também pelos estímulos necessários à fibrólise (HEMMANN *et al.*, 2007).

Os mecanismos responsáveis pelo reparo do tecido hepático com redução do tecido fibroso e aumento da sobrevivência dos animais tratados com terapia celular ainda são bastante discutidos. Embora Lagasse e colaboradores (2000) tenham descrito que

células-tronco de medula óssea são capazes de se diferenciar em hepatócitos no modelo experimental de tirosinemia tipo I, onde o camundongo é deficiente da enzima *Fah*<sup>-/-</sup>, Vassiloupoulos e colaboradores (2003) e Wang e colaboradores (2003) concluíram que o principal mecanismo de geração dos hepatócitos a partir de medula-óssea é a fusão celular. Utilizando o modelo de lesão induzida por CCl<sub>4</sub>, Jang e colaboradores (2004) demonstraram que uma população purificada de células-tronco da medula óssea é capaz de se diferenciar em hepatócitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. No modelo de fibrose por infecção pelo *S. mansoni*, observamos a presença de células transplantadas no parênquima hepático, sugerindo que algumas destas células possam originar novos hepatócitos.

Além da fusão e da diferenciação celular, outro mecanismo bastante discutido tem sido o da liberação de fatores que exerçam funções parácrinas sobre o tecido lesado pelas células-tronco injetadas (Yoon *et al.*, 2005). Neste sentido, Piscaglia e colaboradores (2005) descreveram um aumento dos níveis de HGF, que é um fator importante no processo de regeneração hepática, em fígados de ratos tratados com células de medula óssea. No entanto, este estudo não nos permite concluir que são as próprias células transplantadas que estão produzindo o HGF. É possível ainda que mais de um mecanismo resultante da terapia celular esteja agindo de forma a reparar o tecido hepático lesado.

A terapia celular pode estar aumentando ou diminuindo a produção de mediadores necessários à fibrogênese ou à fibrólise hepática. Higashiyama e colaboradores (2007) verificaram um aumento na síntese da metaloproteinase 9 (MMP-9) após a terapia celular. A MMP-9 já havia sido descrita anteriormente por sua habilidade em degradar colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Além disto, a MMP-9 parece participar no recrutamento de células da medula óssea para áreas

de lesão hepática (KOLLET *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2003). Desta forma, verificamos que as MMPs atuam não apenas na degradação da matriz extracelular, mas também na produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e outras proteínas necessárias a regulação da resposta inflamatória. O papel destas e de outras moléculas envolvidas no processo de reparo, de diminuição de fibrose e inflamação estão sendo estudadas nos nossos modelos de lesões crônicas do fígado.

Uma vez lesado, vários tipos celulares vão atuar no processo de reparo e de cicatrização do fígado. Estudos têm demonstrado o papel das células estreladas na produção da fibrose hepática após lesão tecidual. As células estreladas são células armazenadoras de gordura e vitamina A, que, sob a ação de citocinas fibrogênicas (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF e outras), têm a capacidade de se diferenciar em miofibroblastos e fibroblastos, e se engajar na síntese ativa dos elementos da matriz extracelular (FRIEDMAN *et al.*, 1985). Nossos resultados mostraram que, após a terapia celular, os animais com lesão hepática decorrente da esquistossomose mansônica apresentaram níveis significativamente reduzidos de TGF- $\beta$ . A redução desta potente citocina pró-fibrogênica nos leva a crer que os mecanismos envolvidos na melhora hepática após a terapia celular podem estar correlacionados com alterações do microambiente hepático, podendo exacerbar a produção de citocinas antifibrogênicas ou impedir as células estreladas de secretar TGF- $\beta$  (FANG *et al.*, 2004). Desta forma, verifica-se, mais uma vez, a existência de mecanismos parácrinos que podem estar atuando no processo de redução da fibrose (KINNAIRD *et al.* 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Outro modelo crônico utilizado em nosso estudo para avaliar os efeitos da terapia com células mononucleares de medula óssea foi o da infecção experimental de camundongos pelo *S. mansoni*. O modelo da esquistossomose mansônica difere do modelo do CCl<sub>4</sub>, pois os animais não apresentam significativa morte hepatocelular, não

evoluindo para cirrose hepática. Dois quadros anátomo-patológicos distintos podem ocorrer: um representado pela presença de granulomas isolados no parênquima hepático, e o outro por reproduzir a fibrose periportal semelhante à que ocorre em seres humanos.

Em nossos estudos, animais infectados cronicamente pelo *S. mansoni* apresentaram uma redução no percentual de tecido fibroso tanto no espaço porta quanto nos granulomas hepáticos. Embora o percentual de tecido fibroso também tenha diminuído após terapia celular nos animais esquistossomóticos, essa redução foi menor do que a dos animais cirróticos. Estudos em animais experimentalmente infectados com *S. mansoni* têm demonstrando a capacidade de regressão da fibrose periportal e dos granulomas após terapia com droga anti-helmíntica (CAMERON & GANGULY, 1964). Todavia, esta regressão é mais acentuada na fase aguda da doença. Já na fase crônica o processo de degradação requer um tempo mais prolongado (ANDRADE & GRIMAUD, 1988).

Andrade & Grimaud (1988) atribuíram que a resistência à degradação do tecido fibroso na esquistossomose se deve à presença de diferentes tipos de colágenos, sendo o colágeno III, presente na fase aguda, mais facilmente degradado que o colágeno tipo I, predominante na fase crônica. Os resultados obtidos com os estudos de degradação do tecido fibroso em modelo de cirrose desenvolvida pelo uso do CCl<sub>4</sub> em ratos têm sido contraditórios. Quinn e Higginson (1965) descreveram que todos os parâmetros são reversíveis na cirrose experimental, exceto os nódulos regenerativos. De uma forma geral, a reversibilidade da fibrose hepática é um assunto bastante controverso. Atualmente acredita-se que a fibrose pode diminuir com o tempo, independente de terapia, tanto em animais quanto em seres humanos, se o estímulo causador da lesão hepática for retirado (DI VINÍCIUS *et al.*, 2005; WANLES *et al.*, 2000).



Um número elevado de células ovais foi observado nos animais esquistossomóticos e cirróticos após a terapia celular. A origem destas células tem sido bastante estudada nos últimos anos. Se estas células estão presentes no tecido hepático, migram da medula ou são resultantes de diferenciação de outros tipos celulares hepáticos ainda não foi estabelecido. A habilidade da células ovais em se diferenciar em hepatócitos e células do ducto biliar já esta bem demonstrada (EVARTS *et al.*, 1987; TEE *et al.*, 1994). Todavia, as células ovais parecem participar na regeneração do fígado apenas em situações onde o dano hepático é intenso ou quando a capacidade proliferativa dos hepatócitos esta bloqueada (FAUSTO *et al.*, 2006; FAUSTO & CAMPBELL, 2003).

Alterações de ordem bioquímica não são comuns em lesões esquistossomóticas devido à integridade do parênquima hepático nessa doença. No entanto, já existe relato de que, em camundongos, a infecção pelo *S. mansoni* causa hipoalbuminemia (SABER *et al.*, 1983). Nossos resultados confirmaram esta diminuição da produção de albumina no fígado dos animais infectados. Após a terapia celular, o número de grânulos de albumina foi significativamente maior no fígado de camundongos tratados, embora o padrão normal não tenha sido completamente restabelecido. A baixa na produção de albumina não é uma característica comum em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. No entanto, a hipoalbuminemia em crianças infectadas por *S. mansoni* já foi relatada (COOK *et al.*, 1974). O restabelecimento completo dos níveis séricos de albumina já foi descrito em ratos com lesão hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub> e submetidos à terapia celular (OYAGI *et al.*, 2006). Em nossos estudos foi possível visualizar alguns hepatócitos originados das células da medula óssea. Todavia, o número de células encontrados no parênquima é pequeno, o que parece não interferir na melhora da produção de albumina. Isso nos leva a crer que a melhora na produção de albumina encontrada é decorrente da

melhora do tecido hepático após a terapia celular. Como já citado anteriormente, a terapia celular causou a diminuição do tecido fibroso, o que pode contribuir para o aumento do reparo de lesões hepáticas.

Os resultados obtidos em nosso trabalho demonstram que as células mononucleares de medula óssea não só podem migrar para os sítios de lesões crônicas, mas sugerem que estas participem ativamente da redução do tecido fibroso e da melhora hepática diretamente ou indiretamente, através da liberação de mediadores que podem atuar nas células residentes. Embora os animais GFP<sup>+</sup> venham sendo uma importante ferramenta nos estudos pré-clínicos de terapia celular nas hepatopatias, chamamos a atenção para a grande quantidade de autofluorescência no tecido hepático fibroso, especialmente nas áreas portais (HIGASHIYAMA *et al.*, 2007). No modelo de cirrose, esta fluorescência deve-se à presença de um grande número de células, provavelmente células de Kupffer, observados em camundongos tratados com CCl<sub>4</sub> (QUINTANA-BUSTAMANTE *et al.*, 2006). Uma alternativa seria o uso de animais transgênicos para  $\beta$ -galactosidase ou a utilização de outros métodos de análise como o uso da técnica de FISH para detecção de cromossomos dos doadores de sexos oposto.

A partir dos resultados obtidos em estudos experimentais, já foi possível iniciar estudos clínicos em pacientes com diferentes hepatopatias. A tentativa de restaurar a massa hepática funcional utilizando a atividade anti-fibrótica das células-tronco verificada na terapia celular em modelos experimentais têm servido de base para utilização desta terapia nas doenças do fígado (KALLIS *et al.*, 2007). Estudos clínicos realizados pelo nosso grupo e por outros têm demonstrado que a terapia com células de medula óssea autóloga é segura e exequível, chegando alguns pacientes a apresentar melhora no padrão de albumina e bilirrubina (AM ESCH *et al.* 2005; GORDON *et al.*, 2006; LYRA *et al.*, 2007; TERAJ *et al.*, 2006).

Embora estudos clínicos de terapia celular em DCPF já tenham sido iniciados, uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na melhora após terapia é necessária para o aperfeiçoamento dos protocolos terapêuticos. Neste contexto, estudos experimentais visando ao entendimento dos mecanismos hepáticos envolvidos são de grande importância. Se levarmos em consideração os diferentes tipos de DCPF existentes, poderemos visualizar a necessidade de terapias diferenciadas tanto em tempo, via de administração e dose de células infundidas. Além disso, apesar de não terem sido relatados efeitos adversos nos estudos clínicos realizados, um acompanhamento mais prolongado é necessário para se comprovar a segurança terapêutica à longo prazo, bem como esclarecer o real valor desta terapia nas doenças hepáticas.

## **7 CONCLUSÕES**

---

1. É possível obter-se um quadro de cirrose hepática no camundongo pelo uso do CCl<sub>4</sub> associado ou não ao EtOH por pelo menos 6 meses de estímulos repetidos em intervalos curtos, com desenvolvimento de hepatocarcinomas.
2. Células mononucleares de medula óssea injetadas em animais com doenças crônicas do fígado migram para o tecido lesado.
3. Células mononucleares de medula óssea injetadas em animais com lesões crônicas sofrem alterações morfológicas e permanecem nos locais de lesão por pelo menos dois meses após a terapia.
4. A terapia com células mononucleares de medula óssea reduz o tecido fibroso em lesões hepáticas crônicas.
5. A redução do tecido fibroso observada nos animais após terapia com células mononucleares de medula óssea é acompanhada por uma diminuição da produção de TGF- $\beta$ .
6. Células ovais estão presentes em maior número no parênquima hepático lesado após a terapia celular.
7. A terapia com células mononucleares de medula óssea restabeleceu parcialmente a produção de albumina em animais esquistossomóticos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALISON, M.R.; GOLDING, M.; SARRAF, C.E. Liver stem cells: when the going gets tough they get going. *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 78, p. 365-81, 1997.

AM ESCH JS, KNOEFEL WT, KLEIN M, GHODSIZAD A, FUERST G, POLL LW, PIECHACZEK C, BURCHARDT ER, FEIFEL N, STOLDT V, STOCKSCHLÄDER M, STOECKLEIN N, TUSTAS RY, EISENBERGER CF, PEIPER M, HÄUSSINGER D, HOSCH SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.*, v.23, p. 463-70, 2005.

ANDRADE, Z.A. Fibrogênese hepática. *An. Acad. Med. Bahia*, v.2, p.179-190, 1998.

ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver (Experimental observation on murine schistosomiasis). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 82, p. 325-334, 1987.

ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). *Int. J. Exp. Pathol.*, v. 74, p. 195-202, 1993.

ANDRADE, Z.A., GRIMAUD, J.A. Morphology of chronic collagen resorption. A study on the late stages of schistosomal granuloma involution. *Am. J. Pathol.*, v.132, p. 389-399, 1988

ARTHUR, M.J.; MANN, D. A.; IREDALE, J.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 13, (suppl), p. S33-S38, 1998.

ASSMUS, B.; SCHÄCHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN, M.; LEHMANN, R.; DÖBERT, N.; GRÜNWARD, F.; AICHER, A.; URBICH, C.; MARTIN, H.; HOELZER, D.; IMMELER, S.; ZEIHNER, A.M. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, v. 106, p. 3009-3017, 2002.

BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 51, p. 1-14, 1957.

BOSMA, A.; BROUWER, A.; SEIFERT, W.F.; KNOOK, D.L. Synergism between ethanol and carbon tetrachloride in the generation of liver fibrosis. **J. Pathol.**, v. 156, p. 15-21, 1988.

BRAUN, L.; MEAD, J.E.; PANZICA, M.; MIKUMO, R.; BELL, G.I.; FAUSTO, N. Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 1539-1543, 1988.

CAMERON, G.R., GANGULY, N.C. An experimental study of the pathogenesis and reversibility of schistosomal hepatic fibrosis. **J Pathol Bacteriol.** v. 87, p.217-237, 1964.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J. Cell Biochem.**,v.98, p.1076-84, 2006.

CHANG, M.L.; YEH, C.T.;CHANG, P.Y.; CHEN, J.C. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, p. 4167-4172, 2005.

CHEEVER, A. W. A quantitative post- mortem study of schistosomiasis mansoni in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 17, p. 38-64, 1965.

CHEN, S., LIU, Z., TIAN, N., ZHANG, J., YEI, F., DUAN, B., ZHU, Z., LIN, S., KWAN, T.W. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. **J Invasive Cardiol.**,v. 18, p. 552-556, 2006.

CHINZEI, R.; TANAKA, Y.; SHIMIZU-SAITO, K.; HARA, Y.; KAKINUMA, S.; WATANABE, M.; TERAMOTO, K.; ARII, S.; TAKASE, K.; SATO, C.; TERADA, N.; TERAOKA, H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. **Hepatology**, v. 36, p. 22-29, 2002

COOK, J.A.; BAKER, S.T.; WARREN, K.S.; JORDAN, P. A controlled study of morbidity of *schistosomiasis mansoni* in St. Lucian children, based on quantitative egg excretion. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23, p. 625-633, 1974.

CORRAO, G.; ARICO, S. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. **Hepatology**, v. 27, p. 914-919, 1998.

COURA, J.R.; CONCEIÇÃO, M.J. Correlação entre carga parasitária do *S. mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 14, p. 93-97, 1981.

CRESSMAN, D.E.; GREENBAUM, L.E.; DE ANGELIS, R.A.; CILIBERTO, G.; FURTH, E.E.; POLI, V.; TAUB, R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. **Science**, v. 274, p. 1379-1383, 1996.

De WITT, W. B.; WARREN, K. S. Hepato-splenic schistosomiasis in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 8, p. 440-446, 1959.

DI CAMPLI, C.; PISCAGLIA, A.C.; PIERELLI, L.; RUTELLA, S.; BONANNO, G.; ALISON, M.R.; MARIOTTI, A.; VECCHIO, F.M.; NESTOLA, M.; MONEGO, G.; MICHETTI, F.; MANCUSO, S.; POLA, P.; LEONE, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. **Dig. Liver Dis.**, v. 36, p. 603-613, 2004.

DI VINICIUS I, BAPTISTA AP, BARBOSA AA, ANDRADE ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. **Pathol. Res. Pract**, v. 201, p. 449-456, 2005.

ESCHENBRENNER A.B., MILLER, E. Liver necrosis and the induction of carbon tetrachlorid hepatomas in strain A mice. **J Natl Cancer Inst**, v.6, p. 325-341, 1945

EVARTS, R.P.; NAGY, P.; MARSDEN, E.; THORGEIRSSON, SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1737-1740, 1987.

EYRE, D.R.; PAZ, M.A.; GALLOP, P.M. Cross-linking in collagen and elastin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 53, p. 717-48, 1984.

FALANGA, V., IWAMOTO, S., CHARTIER, M., YUFIT, T., BUTMARC, J., KOUTTAB, N., SHRAYER, D., CARSON, P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds **Tissue Eng.**, v.13, p. 1299-1312, 2007.

FANG, B.; SHI, M.; LIAO, L.; YANG, S.; LIU, Y.; ZHAO, R.C. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Transplantation**, v. 78, p. 83-88, 2004.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. **Mechanisms of Development**, v.120, p. 117-130, 2003.

FAUSTO, N., CAMPBELL, J.S., RIEHLE, K.J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43 (2 Suppl 1), p. S45-S53, 2006

FERREIRA, L.A.; ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 441-447, 1993.

FRIEDMAN, S.L.; ROCKEY, D.C.; MCGUIRE, R.F.; MAHER, J.J.; BOYLES, J.K.; YAMASAKI, G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. **Hepatology**, v. 15, p. 234-243, 1992.

FRIEDMAN, S.L.; ROLL, F.J.; BOYLES, J.; BISSELL, D.M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, p. 8681-8685, 1985.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Semin. Liver Dis**, v. 21, p. 311-335, 2001.

GOMES, A.T., CUNHA, L.M., BASTOS, C.G., MEDRADO, B.F., ASSIS, B.C., ANDRADE, Z.A. *Capillaria hepatica* in rats: focal parasitic hepatic lesions and septal fibrosis run independent courses. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.101, p.895-898, 2006.

GORDON, M.Y., LEVICAR, N., PAI, M., BACHELLIER, P., DIMARAKIS, I., AL-ALLAF, F., M'HAMDI, H., THALJI, T., WELSH, J.P., MARLEY, S.B., DAVIES, J., DAZZI, F., MARELLI-BERG, F., TAIT, P., PLAYFORD, R., JIAO,



L., JENSEN, S., NICHOLLS, J.P., AYAV, A., NOHANDANI, M., FARZANEH, F., GAKEN, J., DODGE, R., ALISON, M., APPERLEY, J.F., LECHLER, R., HABIB, N.A. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. **Stem Cells.**, v. 24, p. 1822-1830, 2006.

GOTARDO, B.M.; ANDRADE, R.G.; OLIVEIRA, L.F.; ANDRADE, Z.A. Production of septal fibrosis of the liver by means of foreign protein injections into rats. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 577-580, 2003.

GRESSNER, A.M.; WEISKIRCHEN, R.; BREITKOPF, K.; DOOLEY, S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci.**, v. 17, p. 793-807, 2002.

GROMPE, M.; AL-DHALIMY, M.; FINEGOLD, M.; OU, C.N.; BURLINGAME, T.; KENNAWAY, N.G.; SORIANO, P. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. **Genes Dev.**, v. 7, p. 2298-2307, 1993.

HEIDELBAUGH, J.J.; SHERBONDY, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. **Am. Fam. Phys.**, v. 74, p. 767-776, 2006.

HEMMANN, S.; GRAF, J.; RODERFELD, M.; ROEB, E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **J. Hepatol.**, v. 46, p. 955-975, 2007.

HIGASHIYAMA, R.; INAGAKI, Y.; HONG, Y.Y.; KUSHIDA, M.; NAKAO, S.; NIIOKA, M.; WATANABE, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y.; SHIOTA, G.; OKAZAKI, I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 45, p. 213-222, 2007.

HIGGINS, G.M.; ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver: I. restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. **Arch. Pathol.**, v. 12, p. 186-202, 1931.

HUSSAIN, S.Z., STROM, S.C.; KIRBY, M.R.; BURNS, S.; LANGEMEIJER, S.; UEDA, T.; HSIEH, M.; TISDALE, J.F. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells *in vitro*. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, p. 1755-1763, 2005.

IREDALE, J.P. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. **BMJ**, v. 327, p. 143-147, 2003.

IREDALE, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 539-548, 2007.

JANG, Y.Y.; COLLECTOR, M.I.; BAYLIN, S.B.; DIEHL, A.M.; SHARKIS, S.J. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **Nat. Cell Biol.**, v. 6, p. 532-539, 2004.

KALLIS, Y.N.; ALISON, M.R.; FORBES, S.J. Bone marrow stem cells and liver disease. **Gut**, v.56, p.716-724, 2007.

KATRITSIS, D.G., SOTIROPOULOU, P.A., KARVOUNI, E., KARABINOS, I., KOROVESIS, S., PEREZ, S.A., VORIDIS, E.M., PAPAMICHAIL, M. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. **Catheter Cardiovasc Interv.**, v. 65, p. 321-329, 2005.

KEEFFE, E.B. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement, Keeffe EB. **Gastroenterology**, v. 120, p. 749-762, 2001.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; SHOU, M.; LEE, C.W.; BARR S, FUCHS S, EPSTEIN, S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation**, v. 109, p. 1543-1549, 2004.

KISSELEVA, T.; UCHINAMI, H.; FEIRT, N.; QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; SEGOVIA, J.C.; SCHWABE, R.F.; BRENNER, D.A. Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. **J. Hepatol.**, v. 45, p. 429-438, 2006.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair- A new therapeutic concept? **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 570-582, 2003.

KOLLET, O.; SHIVTIEL, S.; CHEN, Y.Q.; SURIAWINATA, J.; THUNG, S.N.; DABEVA, M.D.; KAHN, J.; SPIEGEL, A.; DAR, A.; SAMIRA, S.; GOICHBERG, P.; KALINKOVICH, A.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; NAGLER, A.; HARDAN, I.; REVEL, M.; SHAFRITZ, D.A.; LAPIDOT, T. HGF, SDF-1, and

MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 160-169, 2003.

KUMAR, M.; SARIN, S.K. Is cirrhosis of the liver reversible? **Indian J. Pediatr.**, v. 74, p. 393-399, 2007.

LAGASSE, E.; CONNORS, H.; AL-DHALIMY, M.; REITSMA, M.; DOHSE, M.; OSBORNE, L.; WANG, X.; FINEGOLD, M.; WEISSMAN, I.L.; GROMPE, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. **Nat. Méd.**, v. 6, p. 1229-1234, 2000.

LAKE, J.R. Evaluation and management of prospective liver transplant candidates. In: NORMAN, D.J.; TURKA, L.A. (Eds.). **Primer on Transplantation**. 2nd ed. American Society of Transplantation, 2001. p. 523-528.

LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S.; REISCH, J.S.; SCHIÄDT, F.V.; OSTAPOWICZ, G.; SHAKIL, A.O.; LEE, W.M. Acute Liver Failure Study Group . Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. **Hepatology**, v. 42, p. 1364-72, 2005.

LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, GOTHERSTROM C, HASSAN M, UZUNEL M, RINGDEN O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet.**, v. 363, p.1439-1441, 2004.

LEE, W.M. Acute liver failure in the United States. **Semin. Liver Dis.**, v. 23, p. 217-226, 2003.

LYRA, A.C., SOARES, M.B., DA SILVA, L.F., FORTES, M.F., SILVA, A.G., MOTA, A.C., OLIVEIRA, S.A., BRAGA, E.L., DE CARVALHO, W.A., GENSER, B., DOS SANTOS, R.R., LYRA, L.G. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World J. Gastroenterol.**,v.13, p.1067-1073, 2007

MACSWEEN, R.N.M.; ANTHONY, P.P.; SCHEUER, P.J. **Pathology of the Liver**. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 342-363, 1987.

MARRA, F. Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation. **J. Hepatol.**, v. 31, p. 1120-1130, 1999.

MICHALOPOULOS, G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. **Faseb J.**, v. 4, p. 176-187, 1990.

MIMEAULT, M., HAUKE, R., BATRA, S.K. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. **Clin Pharmacol Ther.** 2007 , 82:252-264.

MITCHELL, J. R.; JOLLOW, D. J., POTTER, W. Z.; GILLETTE, J. R.; BRODIE, B. B. Acetaminophen-induced hepatic necrosis: I. Role of drug metabolism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 187, p. 185-194, 1973.

NAKAMURA, K.; TANAKA, Y.; MITSUBUCHI, H.; ENDO, F. Animal models of tyrosinemia. **J. Nutr.**, v. 137, p. 1556S-1560S, 2007.

OKAZAKI, I; MARUYAMA, K. Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. **Nature**, v. 252, p. 49-50, 1974.

OPIE, E.L. The pathogenesis of tumors in the liver produced by butter yellow. **J. Exp. Med.**, v. 80, p. 231-246, 1944.

OSTAPOWICZ, G.; FONTANA, R.J.; SCHIÄDT, F.V.; LARSON, A.; DAVERN, T.J.; HAN, S.H.; MCCASHLAND, T.M.; SHAKIL, A.O.; HAY, J.E.; HYNAN, L.; CRIPPIN, J.S.; BLEI, A.T.; SAMUEL, G.; REISCH, J.; LEE, W.M. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. **Ann. Intern. Med.**, v. 137, p. 947-954, 2002.

OYAGI, S.; HIROSE, M.; KOJIMA, M.; OKUYAMA, M.; KAWASE, M.; NAKAMURA, T.; OHGUSHI, H.; YAGI, K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. **J. Hepatol.**, v. 44, p. 742-748, 2006.

PAKU, S.; SCHNUR, J.; NAGY, P.; THORGEIRSSON, S.S. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1313-1323, 2001.

PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.M.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, v. 284, p. 1168-1170, 1999.

PINZANI, M.; GESUALDO, L.; SABBAH, G.M.; ABBOUD, H.E. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J. Clin. Invest.*, v. 84, p.1786-1793, 1989.

PISCAGLIA, A.C.; ZOCCO, M.A.; DI CAMPLI, C.; SPARANO, L.; RUTELLA, S.; MONEGO, G.; BONANNO, G.; MICHETTI, F.; MANCUSO, S.; POLA, P.; LEONE, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. How does human stem cell therapy influence gene expression after liver injury? Microarray evaluation on a rat model. *Dig. Liver Dis.*, v. 37, p. 952-963, 2005.

PLAA, G.L. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 40, p. 42-65, 2000.

POTTEN, C.S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, v. 110, p. 1001-1020, 1990.

QUINN, P.S., HIGGINSON J. Reversible and irreversible changes in experimental cirrhosis. *Am. J. Pathol.*, v.47, p.353-369, 1965.

QUINTANA-BUSTAMANTE, O., ALVAREZ-BARRIENTOS, A., KOFMAN, A.V., FABREGAT, I., BUEREN, J.A., THEISE, N.D., SEGOVIA, J.C. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. v.43, p.108-116, 2006.

RECKNAGEL, R.O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, v. 19, p. 145-208, 1967.

ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology*, v. 43, p. S113-S120, 2006.

ROJKIND, M.; DUNN, M.A. Hepatic Fibrosis. *Gastroenterology*, v. 76, p. 849-863, 1979.

ROSA, H.; PARISE, E.R.; PARANHOS, F.R.; BRAGA, A.L.; FREITAS, A.S.; HIDALGO, A.N.; MOR, M.B. Controlled production of cirrhosis in the rat liver. **Arq. Gastroenterol.**, v. 28, p. 39-43, 1991.

RUSSO, F.P.; ALISON, M.R.; BIGGER, B.W.; AMOFAH, E.; FLOROU, A.; AMIN, F.; BOU-GHARIOS, G.; JEFERRY, R.; IREDALE, J.P.; FORBES, S.J. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1807-1821, 2006.

SABER, M.A.; SHAFRITZ, D.A.; ZERN, M.A. Changes in collagen and albumin mRNA in liver tissue of mice infected with *Schistosoma mansoni* as determined by in situ hybridization. **J. Cell Biol.**, v. 97, p. 986-992, 1983.

SAKAIDA, I.; TERAI, S.; NISHINA, H.; OKITA, K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. **Med. Mol. Morphol.**, v. 38, p. 197-202, 2005.

SAKAIDA, I.; TERAI, S.; YAMAMOTO, N.; AOYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; NISHINA, H.; OKITA. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 40, p. 1304-1311, 2004.

SCHALM, S.W. The diagnosis of cirrhosis: clinical relevance and methodology. **J. Hepatol.**, v. 27, p. 1118-1119, 1997.

SCOTT, R.E. Differentiation, differentiation / gene therapy and cancer. **Pharmacol. Ther.**, v. 73, p. 51-65, 1997.

SILVA, G.V.; LITOVSKY, S.; ASSAD, J.A.; SOUSA, A.L.; MARTIN, B.J.; VELA, D.; COULTER, S.C.; LIN, J.; OBER, J.; VAUGHN, W.K.; BRANCO, R.V.; OLIVEIRA, E.M.; HE, R.; GENG, Y.J.; WILLERSON, J.T.; PERIN, E.C. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. **Circulation**, v. 111, p. 150-156, 2005.

SLATER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, p. 1-15, 1984.

STARKEL, P.; HORSMANS, Y.; SEMPOUX, C.; DE SAEGER, C.; WARY, J.; LAUSE, P.; MAITER, D.; LAMBOTTE, L. After portal branch ligation in rat, nuclear factor kappaB, interleukin-6, signal transducers and activators of

transcription 3, c-fos, c-myc, and c-jun are similarly induced in the ligated and nonligated lobes. **Hepatology**, v. 29, p. 1463–1470, 1999.

TAMAYO, R. P. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? **Hepatology**, v. 3, p. 112-120, 1983.

TANG, X.P.; YANG, X.; TAN, H.; DING, Y.L.; ZHANG, M.; WANG, W.L. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p. 1999-2003, 2003.

TAYLOR, R.M.; DAVERN, T.; MUNOZ, S.; HAN, S.H.; MCGUIRE, B.; LARSON, A.M.; HYNAN, L.; LEE, W.M.; FONTANA, R.J.; US ACUTE LIVER FAILURE STUDY GROUP . Fulminant hepatitis A virus infection in the United States: Incidence, prognosis, and outcomes. **Hepatology**, v. 44, p. 1589-1597, 2006.

TEE, L.B.; KIRILAK, Y.; HUANG, W.H.; MORGAN, R.H.; YEOH, G.C. Differentiation of oval cells into duct-like in preneoplastic liver of rat placed on a choline-deficient diet supplement with ethionine. **Carcinogenesis**, v. 15, p. :4116-4124, 1994.

TERAI, S.; ISHIKAWA, T.; OMORI, K. A.; OYAMA, K.; MARUMOTO, Y.; URATA, Y.; YOKOYAMA, Y.; UCHIDA, K.; YAMASAKI, T.; FUJII, Y.; OKITA, K.; SAKAIDA, I. Improved liver function in liver cirrhosis patients after autologous bone marrow cell infusion therapy. **Stem Cells**, v. 24, p. 2292–2298, 2006.

THOMAS, S. H. L. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. **Pharmacol. Ther.**, v. 60, p. 91–120, 1993.

TSUI, J.I.; PLETCHER, M.J.; VITTINGHOFF, E.; SEAL, K.; GONZALES, R. Hepatitis C and hospital outcomes in patients admitted with alcohol-related problems. **J. Hepatol.**, v. 44, p. 262–266, 2006.

TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Semin. Liver Dis.**, v. 10, p. 56-65, 1990.

VASSILOPOULOS, G.; WANG, P.R.; RUSSELL, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. **Nature**, v. 422, p. 901-904, 2003.

VILQUIN, J.T. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives. Mini-review. *Acta Myol.*, v. 24, p. 119-27, 2005.

WANG, X.; FOSTER, M.; AL-DHALIMY, M.; LAGASSE, E.; FINEGOLD, M.; GROMPE, M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 100, p. 11881-11888, 2003.

WANLESS, I.R.; NAKASHIMA, E.; SHERMAN, M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 124, p. 1599-1607, 2000.

WATANABE, A.; SHIOTA, T.; HAYASHI, S.; SAKATA, T.; NAGASHIMA, H. Pleomorphism of hepatic regeneration. *Res. Exp. Med.*, v. 184, p. 49-57, 1984.

WATANABE, Y.; HARUYAMA, T.; AKAIKE, T. Liver-derived matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) recruits progenitor cells from bone marrow into the blood circulation. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, p. 564-568, 2003

YANG C, ZEISBERG M, MOSTERMAN B, SUDHAKAR A, YERRAMALLA U, HOLTHAUS K, XU L, ENG F, AFDHAL N, KALLURI R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.*, v. 124, p.147-59, 2003.

YANNAKI, E.; ATHANASIOU, E.; XAGORARI, A.; CONSTANTINO, V.; BATSIS, I.; KALOYANNIDIS, P.; PROYA, E.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; FASSAS, A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp. Hematol.*, v. 33, p. 108-119, 2005.

YOKOYAMA, Y., TERAJ, S., ISHIKAWA, T., AOYAMA, K., URATA, Y., MARUMOTO, Y., NISHINA, H., NAKAMURA, K., OKITA, K., SAKAIDA, I. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol.* v.18, p.4-12, 2006.

YOON, Y.S.; WECKER, A.; HEYD, L.; PARK, J.S.; TKEBUCHAVA, T.; KUSANO, K.; HANLEY A.; SCADOVA, H.; QIN, G.; CHA, D.H.; JOHNSON, K.L.; AIKAWA, R.; ASAHARA, T.; LOSORDO, D.W. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.*, v. 115, p. 326-338, 2005.



ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 3-19.

ZHAO, D.C.; LEI, J.X.; CHEN, R.; YU, W.H.; ZHANG, X.M.; LI, S.N.; XIANG, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, p. 3431-3440, 2005.

Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/sangue/glossario/index.htm#22> Acesso em: 21/junho/2007.

**9 ANEXO I**

---

## Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease

Andre Castro Lyra, Milena Botelho Pereira Soares, Luiz Flavio Maia da Silva, Marcos Fraga Fortes, André Goyanna Pinheiro Silva, Augusto César de Andrade Mota, Sheilla A Oliveira, Eduardo Lorens Braga, Wilson Andrade de Carvalho, Bernd Genser, Ricardo Ribeiro dos Santos, Luiz Guilherme Costa Lyra

Andre Castro Lyra, Milena Botelho Pereira Soares, Luiz Flavio Maia da Silva, Marcos Fraga Fortes, André Goyanna Pinheiro Silva, Eduardo Lorens Braga, Wilson Andrade de Carvalho, Ricardo Ribeiro dos Santos, Luiz Guilherme Costa Lyra, Hospital Sao Rafael, Salvador, Bahia, Brazil

Andre Castro Lyra, Eduardo Lorens Braga, Luiz Guilherme Costa Lyra, Gastro-Hepatology Unit, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

Milena Botelho Pereira Soares, Augusto César de Andrade Mota, Sheilla A Oliveira, Ricardo Ribeiro dos Santos, Centro de Pesquisas Goncalo Moniz, Fundacao Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

Sheilla A Oliveira, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes, Fundacao Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil  
Bernd Genser, BGStats Consulting, Graz, Austria  
Supported by IMBT-MCT/CNPq and Monte Tabor/Hospital Sao Rafael

Correspondence to: André Castro Lyra, Gastro-Hepatology Unit, Federal University of Bahia, R Socrates Guanaes Gomes 84/401, Salvador, Bahia 40296720, Brazil. aclyra@atarde.com.br  
Telephone: +55-71-32357048 Fax: +55-71-32357048  
Received: 2006-10-14 Accepted: 2006-11-14

### Abstract

**AIM:** To evaluate the safety and feasibility of bone marrow cell (BMC) transplantation in patients with chronic liver disease on the waiting list for liver transplantation.

**METHODS:** Ten patients (eight males) with chronic liver disease were enrolled to receive infusion of autologous bone marrow-derived cells. Seven patients were classified as Child-Pugh B and three as Child-Pugh C. Baseline assessment included complete clinical and laboratory evaluation and abdominal MRI. Approximately 50 mL of bone marrow aspirate was prepared by centrifugation in a ficoll-hypaque gradient. At least of 100 millions of mononuclear-enriched BMCs were infused into the hepatic artery using the routine technique for arterial chemoembolization for liver tumors. Patients were followed up for adverse events up to 4 mo.

**RESULTS:** The median age of the patients was 52 years (range 24-70 years). All patients were discharged 48 h after BMC infusion. Two patients complained of

mild pain at the bone marrow needle puncture site. No other complications or specific side effects related to the procedure were observed. Bilirubin levels were lower at 1 ( $2.19 \pm 0.9$ ) and 4 mo ( $2.10 \pm 1.0$ ) after cell transplantation than baseline levels ( $2.78 \pm 1.2$ ). Albumin levels 4 mo after BMC infusion ( $3.73 \pm 0.5$ ) were higher than baseline levels ( $3.47 \pm 0.5$ ). International normalized ratio (INR) decreased from 1.48 (SD = 0.23) to 1.43 (SD = 0.23) one month after cell transplantation.

**CONCLUSION:** BMC infusion into hepatic artery of patients with advanced chronic liver disease is safe and feasible. In addition, a decrease in mean serum bilirubin and INR levels and an increase in albumin levels are observed. Our data warrant further studies in order to evaluate the effect of BMC transplantation in patients with advanced chronic liver disease.

© 2007 The WJG Press. All rights reserved.

**Key words:** Bone marrow; Cell transplantation; Liver failure; Stem cell; Cirrhosis

Lyra AC, Soares MBP, da Silva LFM, Fortes MF, Silva AGP, Mota ACA, Oliveira SA, Braga EL, de Carvalho WA, Genser B, dos Santos RR, Lyra LGC. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(7): 1067-1073

<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/1067.asp>

### INTRODUCTION

Chronic liver disease may progress to end-stage liver disease (ESLD), liver failure and death. Patients with ESLD may experience serious complications such as encephalopathy, ascites and esophagogastric variceal hemorrhage. Liver transplantation is the only available therapy for patients with chronic liver failure. Because of the shortage of donated organs, up to 10%-15% of these patients die without receiving an organ in developed countries<sup>[1]</sup>. In some undeveloped countries the number of deaths on the waiting list might be greater. In some regions

of Brazil it takes an average of more than two years until liver transplantation. Therefore, alternative methods such as cell therapy are necessary to increase patient survival on the liver transplant waiting list. Several sources of stem cells have been proposed for cell therapy. Embryonic stem cells are the most potent in terms of their differentiation potential but may be oncogenic when transplanted *in vivo* and their use has been a matter of controversy because of ethical issues<sup>[2]</sup>. A number of studies during the last decade have identified cells both within and outside the liver that have properties of hepatic stem cells and might differentiate into hepatocytes or bile duct epithelial cells<sup>[3-5]</sup>. Hematopoietic tissue is most accessible and of special interest, and it has been demonstrated that bone marrow contains multipotent adult progenitor cells that can generate a variety of cell types found in other tissues<sup>[6-9]</sup>.

Studies in animal models of liver diseases have demonstrated that bone marrow cell (BMC) transplantation may accelerate the liver regeneration process, reduce hepatic fibrosis and improve liver function and survival rate<sup>[9-11]</sup>. However, its mechanism is still controversial. Several studies have suggested that hematopoietic cells may generate hepatocyte-like cells, while others hypothesized that they should act mainly by fusion with hepatocytes or by paracrine effect<sup>[12-15]</sup>. Fusion between hepatocytes and hematopoietic cells produces heterokaryotic hybrid cells that initially contain the genetic elements and organelles of both cell types and may then express the hepatocyte phenotype. Several studies suggest that cytokines and growth factors produced by infused hematopoietic cells may support liver function and repair in adult animals without forming new hepatocytes from the infused cells<sup>[15]</sup>. Based on the findings from other studies that suggest improvement of liver fibrosis in experimental models of liver disease and because bone marrow cell transplantation itself is already an established treatment for hematological and oncological diseases, we conducted a clinical trial to evaluate the safety and feasibility of autologous BMC therapy in patients with chronic liver disease on the waiting list for liver transplantation.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The study group comprised 10 patients with chronic liver disease (8 males, 2 females, age: 24 to 70 years) on the waiting list for liver transplantation. They were enrolled to receive infusion of autologous BMC from September 2005 to January 2006. Informed written consent was obtained from all subjects. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Hospital São Rafael, Salvador, Brazil and by the Brazilian National Ethics Committee (CONEP). Eligible patients had all the following inclusion criteria: age range between 18-75 years, advanced chronic liver disease of different etiologies classified as Child Pugh B or C, absence of liver tumors and appropriate use of contraception method for women of child-bearing potential. Patients were excluded from the study if they had one or more of the following

exclusion criteria: risk for bone marrow aspiration, sepsis, human immunodeficiency virus infection, active hepatic encephalopathy, liver tumor, history of malignant neoplasm except for non-melanoma skin cancer, decompensated heart failure, platelet count < 30 000/mm<sup>3</sup>, international normalized ratio (INR) > 2.2, renal failure (creatinine > 2.5 mg/dL), participation in other clinical trials, pregnancy or lactation.

Baseline assessment included complete clinical and laboratorial evaluation as well as abdominal magnetic resonance imaging to exclude liver tumor. Laboratory tests consisted of complete blood count, serum bilirubin levels, prothrombin time, serum blood glucose, urea, creatinine, alpha-fetoprotein, total proteins and albumin levels, serum aminotransferase concentrations, alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transferase levels, thyroid stimulating hormone (TSH) concentrations. Patients were followed up for adverse events with clinical and laboratory evaluations on d 1, 2, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120 after BMC transplantation.

### Bone marrow cell therapy

Approximately 50 mL of bone marrow was aspirated from the iliac crest. An enriched fraction of bone marrow mononuclear cells was prepared by centrifugation of total bone marrow in a ficoll-hypaque gradient. At least 100 millions of mononuclear-enriched BMC suspended in 20 mL of saline was infused into the hepatic artery of included patients by a catheter, using the routine technique for arterial chemoembolization of liver tumors<sup>[16]</sup>.

### Statistical analysis

Exploratory data analysis was conducted to calculate means, standard deviations and 95% confidence intervals of measurements (laboratory tests, Child Pugh score at baseline at 1 and 4 mo). Relative mean changes at 1 and 4 mo with respect to the baseline level were calculated. To examine the development of laboratory parameters after BMC infusion individual response profiles were plotted as a function of weeks after intervention. In addition, estimates of the mean response profiles and 95% confidence intervals were obtained by calculating moving averages of patients' measurements over a period of 4 weeks and by applying linear interpolation. All statistical analyses were conducted by the statistical software package STATA (StataCorp. 2005. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: StataCorp LP).

## RESULTS

The median age of the study population was 52 years (range 24-70 years). Four patients had alcoholic liver disease, 4 had chronic hepatitis C, one had chronic cholestatic liver disease and one cryptogenic cirrhosis (Table 1). Seven patients were classified as Child-Pugh B and 3 patients as Child-Pugh C. None had a liver tumor.

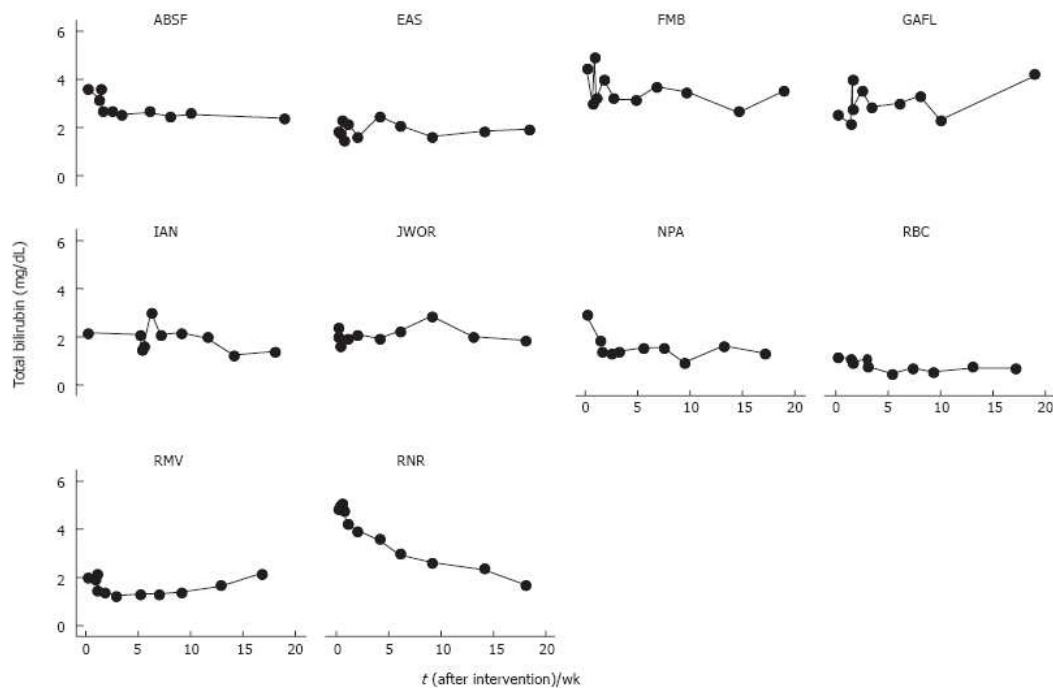
The number of BMCs infused in each patient is shown in Table 1. All patients were discharged 48 h after BMC infusion. Two patients complained of mild pain at the bone marrow needle puncture site. No other complications

**Table 1** Clinical characteristics of studied patients and the number of transplanted autologous BMCs

Patient ID	Age (yr)	Sex	Etiology of cirrhosis	BMCs transplanted ( $n$ )
JWOR	49	Male	Alcohol + HCV	$2.8 \times 10^8$
FMB	60	Male	Alcohol	$5.2 \times 10^8$
EAS	63	Female	HCV	$3.2 \times 10^8$
RNR	24	Male	Cholestatic	$13.1 \times 10^8$
IAN	49	Male	Alcohol + HCV	$2.6 \times 10^8$
NPA	55	Female	Cryptogenic	$3.5 \times 10^8$
RBC	49	Male	Alcohol	$4.8 \times 10^8$
RMV	66	Male	HCV	$3.4 \times 10^8$
GAFL	70	Male	Alcohol	$1.6 \times 10^8$
ABSF	40	Male	HCV	$2.4 \times 10^8$

**Table 2** Characteristics of the distribution of serum bilirubin, albumin and INR levels in 10 patients with chronic liver failure at baseline, 1 and 4 mo after transplantation of autologous BMCs

Bilirubin (mg/dL)	Minimum	Maximum	Mean	Median	Standard deviation	Relative mean change from baseline (%)
Baseline	1.2	4.83	2.78	2.45	1.16	
1 mo	0.5	3.56	2.19	2.28	0.91	-21
4 mo	0.72	4.16	2.1	1.87	1.04	-24
Albumin (unit)						
Baseline	2.5	4.4	3.47	3.5	0.51	
1 mo	2.9	4.5	3.44	3.25	0.52	-1
4 mo	3.1	4.8	3.73	3.6	0.51	7
INR (unit)						
Baseline	1.08	1.89	1.46	1.48	0.23	
1 mo	1.1	1.94	1.44	1.43	0.23	-1
4 mo	1.16	1.75	1.42	1.43	0.18	-3

**Figure 1** Serum bilirubin levels in 10 patients with chronic liver disease as a function of weeks after transplantation of autologous BMCs.

or specific side effects related to the infusion procedure were reported. A 70-year old patient with a history of previous episodes of hepatic encephalopathy developed reversible grade I encephalopathy 33 d after BMC infusion. The episode was controlled without requirement of hospitalization and was not considered an adverse event since 3 identical episodes were documented for this patient in the last year before his inclusion in the study.

Total bilirubin levels were 21% lower at 1 mo ( $2.19 \pm 0.91$ ) and 24% lower at 4 mo ( $2.10 \pm 1.04$ ) after BMC

transplantation that baseline levels ( $2.78 \pm 1.16$ ) (Table 2). When individual response profiles were evaluated, a decrease in total bilirubin levels was observed in 7 of 10 patients after BMC transplantation (Figure 1). The mean profile of bilirubin levels after BMC infusion is shown in Figure 2.

Albumin levels were 1% lower at 1 mo ( $3.44 \pm 0.52$ ) and 7% higher at 4 mo after BMC infusion ( $3.73 \pm 0.51$ ) that baseline levels ( $3.47 \pm 0.51$ ) (Table 2). The analysis of individual levels showed an increase in albumin levels

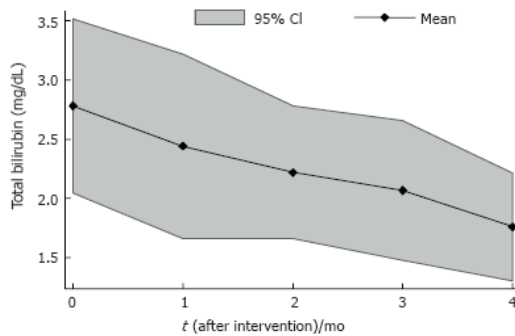


Figure 2 Mean profile of serum total bilirubin levels including a 95% confidence band in 10 patients with chronic liver disease as a function of weeks after transplantation of autologous BMCs.

in 6 patients and a reduction in 1 patient 4 mo after BMC transplantation (Figure 3). The mean profile of serum albumin levels is shown in Figure 4.

INR levels were 1% lower at 1 mo ( $1.44 \pm 0.23$ ) and 4% lower at 4 mo ( $1.42 \pm 0.18$ ) after BMC transplantation that baseline levels ( $1.46 \pm 0.23$ ) (Table 2). INR levels reduced in 7 patients and increased in 1 patient after BMC transplantation (Figure 5). The mean profiles of INR levels are shown in Figure 6.

The data about other relevant laboratory parameters (WBC, hemoglobin, ALT, AST, GGT, creatinine) before and after the intervention are shown in Table 3.

## DISCUSSION

There is an urgent need to search for alternatives to whole organ transplantation. Based on the ability of stem cells to differentiate into specific cell types according to their environment, cell transplantation has become an attractive therapeutic method for the treatment of patients with liver disease aiming, at least, at a temporary support of hepatic function until a liver becomes available for organ transplantation.

This phase I study aimed to evaluate the feasibility and safety of autologous bone marrow cell transplantation into the hepatic artery of patients with advanced chronic liver disease. In the present study, we infused BMCs into the hepatic artery using the same routine technique for arterial chemoembolization of liver tumors which is feasible and not associated with serious local side effects<sup>[6]</sup>, and used the hepatic artery for cell infusion since the blood inflow to the liver could be mostly secured. Our results confirmed the feasibility and safety of BMC infusion into hepatic artery in such patients. BMC transplantation was well tolerated to all patients and only two patients complained of mild pain at the bone marrow needle puncture site. We did not detect any other side effects. The episode of reversible hepatic encephalopathy 33 d after BMC infusion in a 70-year old man with alcoholic cirrhosis was not interpreted as an adverse event related to the procedure because identical episodes were observed in the previous

Table 3 Characteristics of the distribution of laboratory parameters in 10 patients with chronic liver failure at baseline, 1 and 4 mo after BMC transplantation

	Minimum	Maximum	Mean	Median	Standard deviation	Relative mean change from baseline (%)
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>						
Baseline	11.30	16.90	13.16	12.2	1.90	
1 mo	9.50	16.00	12.26	11.95	1.81	-8
4 mo	10.30	15.10	12.80	12.7	1.47	-3
<b>WBC (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>						
Baseline	2.60	5.40	3.94	4	0.97	
1 mo	2.30	5.10	3.35	2.85	1.04	-15
4 mo	2.30	6.00	3.60	3.25	1.14	-9
<b>GGT (U/L)</b>						
Baseline	50.00	543.00	172.20	139	147.50	
1 mo	48.00	474.20	157.20	134.5	129.00	-9
4 mo	47.00	489.67	163.50	132.5	133.25	-5
<b>AST (U/L)</b>						
Baseline	29.00	192.00	100.60	92.5	56.24	
1 mo	26.00	173.00	86.90	79	47.58	-14
4 mo	29.00	180.00	85.80	64	46.87	-15
<b>ALT (U/L)</b>						
Baseline	11.00	120.00	56.00	43	35.54	
1 mo	22.00	115.00	54.80	42.5	32.71	-2
4 mo	17.00	131.00	53.50	41	34.97	-4
<b>Creatinine (mg/dL)</b>						
Baseline	0.60	1.50	0.86	0.8	0.26	
1 mo	0.70	1.30	0.90	0.85	0.20	5
4 mo	0.60	1.20	0.87	0.85	0.19	1

year.

In addition to the evaluation of safety and feasibility, our results indicated that there were alterations of liver function parameters after transplantation of autologous BMCs in patients with advanced chronic liver disease. Four months after BMC transplantation the mean serum bilirubin and INR levels decreased while the mean albumin levels increased. Of note, 7 patients had their bilirubin levels reduced while 6 patients had their albumin levels increased. The greatest reduction in the bilirubin levels was observed in a 24-year old patient (R.N.R.) with chronic cholestatic liver disease who had the highest amount of transplanted BMCs ( $13.1 \times 10^8$ ) compared to the others (Table 1). The number of transplanted BMCs was lower in patients with cirrhosis caused by HCV and in the 70-year old patient.

Recently, two phase I studies using granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) to mobilize BMCs in patients with chronic liver disease were conducted<sup>[17,18]</sup>. Gaia *et al*<sup>[17]</sup> evaluated the feasibility and safety of BMC mobilization in 8 patients with end stage liver cirrhosis following G-CSF administration. Mobilization (monitored by the number of CD34 + ve cells) was observed in all patients after G-CSF administration, which was well tolerated and free of adverse events. Child-Pugh score decreased by 2 or more points in four patients, increased in one patient, while it was unchanged (or decreased by less than 2 points) in three patients. Overall, the MELD score decreased from a median pre-treatment value of 17.5 (range 11-20) to 14.5

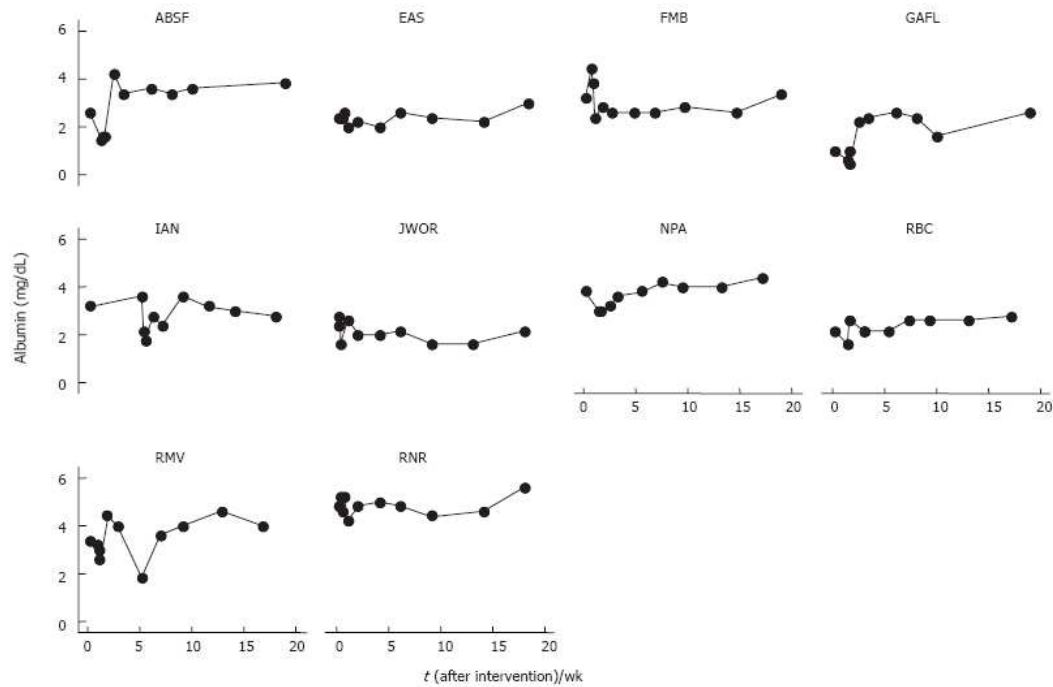


Figure 3 Serum albumin levels in 10 patients with chronic liver disease as a function of weeks after transplantation of autologous BMCs.

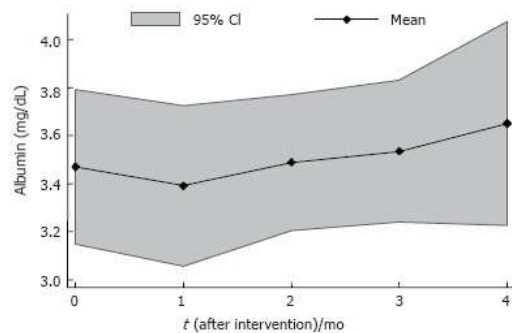


Figure 4 Mean profile of serum albumin levels including a 95% confidence band in 10 patients with chronic liver failure as a function of weeks after transplantation of autologous BMCs.

(range 9–20) at end of follow-up. In another study Gordon *et al.*<sup>[18]</sup> evaluated the safety and tolerability of autologous CD34+ cell injection into five patients with liver insufficiency. Included patients were given subcutaneously 520  $\mu$ g G-CSF and CD34+ cells were collected and then returned to the patients via the hepatic artery or the portal vein. No major complications or specific side effects related to the procedure were observed. Three of the five patients showed a reduction in serum bilirubin and four of five showed an increase in serum albumin. The results of these two studies appear to be in agreement with ours.

The choice of utilizing purified stem cells instead of mononuclear cell fraction depends on a future comparison of the efficacy in the two cell populations. In addition, purification procedures to obtain a specific cell population increase the costs of the therapy.

Studies in animal models of liver diseases have demonstrated that bone marrow cell transplantation decreases hepatic fibrosis and improves survival rate. Sakaida *et al.*<sup>[11]</sup> investigated the effect of BMC transplantation on mice with established liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) administration. Four weeks after BMC transplantation, the mice had significantly reduced liver fibrosis, as assessed by hydroxyproline content in the livers, compared to mice treated with CCl<sub>4</sub> alone. Similar results have been observed in other studies<sup>[9,19,20]</sup>. In addition, improvement in several parameters of liver function, such as albumin and bilirubin levels and prothrombin time has been reported<sup>[9,12,21]</sup>. These experimental studies suggest that BMC infusion may be responsible for the potential beneficial effects on liver function as observed in our clinical study.

Our study was not able to evaluate the efficacy of BMC infusion in patients with liver disease due to its design. Controlled studies would be required to address this issue. Further studies are also necessary to determine the number of BMCs required for achievement of therapeutic effect, which may vary with the patient's age and the etiology of liver disease.

In summary, BMC infusion into the hepatic artery of patients with advanced chronic liver disease is safe and

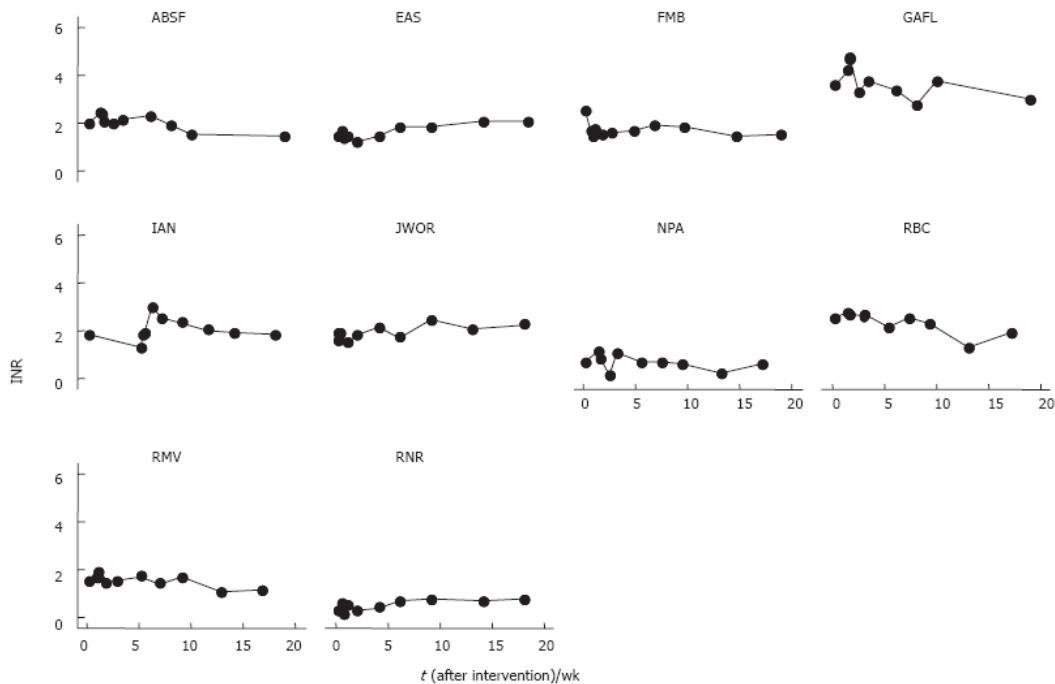


Figure 5 INR levels in 10 patients with chronic liver failure as a function of weeks after transplantation of autologous BMCs.

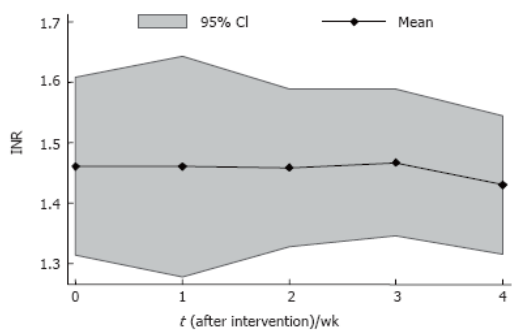


Figure 6 Mean profile of INR levels including a 95% confidence band in 10 patients with chronic liver failure as a function of weeks after transplantation of autologous bone marrow cells.

feasible. In addition, in most patients there is a decrease in mean serum bilirubin and INR levels, and an elevation of serum albumin. Our results warrant further studies in order to evaluate the effects of BMC transplantation in patients with advanced chronic liver disease.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Patricia Seixas A Brandrao, Heleni F de Carvalho, Andrea da S Sant'Ana, Dr. Paulo Engracio M de Souza, Dr Sonia M Duarte Cathala and Dr. Gabriela

Fortes for their invaluable assistance in the care of the patients and Carol O Ramos, Luciano Coelho, Amanda A. Mascarenhas and Carlos Daniel VB de Carvalho for their support in the organization of the clinical data.

#### REFERENCES

- Allen KJ, Buck NE, Williamson R. Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl Immunol* 2005; 15: 99-112
- Teramoto K, Hara Y, Kumashiro Y, Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Asahina K, Teraoka H, Arai S. Teratoma formation and hepatocyte differentiation in mouse liver transplanted with mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Transplant Proc* 2005; 37: 285-286
- Haque S, Haruna Y, Saito K, Nalesnik MA, Atillasoy E, Thung SN, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest* 1996; 75: 699-705
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433
- Yasui O, Miura N, Terada K, Kawarada Y, Koyama K, Sugiyama T. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 329-334
- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- Braun KM, Sandgren EP. Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. *Am J Pathol* 2000; 157: 561-569
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepa-



- 9 Fang B, Shu M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-88
- 10 Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Mod Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- 11 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
- 12 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- 13 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 14 Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes *via in vivo* cell fusion. *Hepatology* 2006; 43: 108-116
- 15 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006; 43: 2-8
- 16 Ahrar K, Gupta S. Hepatic artery embolization for hepatocellular carcinoma: technique, patient selection, and outcomes. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12: 105-126
- 17 Gaia S, Smedile A, Omede P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, Abate ML, Marzano A, Rizzetto M, Tarella C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 13-19
- 18 Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachelier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M Hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davies J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24: 1822-1830
- 19 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 20 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 21 Jang YX, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539

S- Editor Wang J L- Editor Wang XL E- Editor Ma WH

***10 ANEXO II***

---

### **Terapias com células-tronco em doenças hepáticas**

Milena B. P. Soares<sup>1,2</sup>, Sheilla A. Oliveira<sup>1,3</sup>, Bruno S. F. Souza<sup>1</sup>, Luiz Antonio R. de Freitas<sup>1</sup>, André C. Lyra<sup>2,4</sup>, Luiz Guilherme C. Lyra<sup>2,4</sup>, Ricardo Ribeiro dos Santos<sup>1,2</sup>.

1 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz/BA, Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40295-710 Salvador, BA.

2 Hospital São Rafael, Av. São Rafael, 2152, São Marcos, 41256900, Salvador, BA.

3 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz/PE, Av Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE.

4 Universidade Federal da Bahia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos- 6º andar, Rua Augusto Viana s/n, Canela, 40110160, Salvador/BA.

## **Introdução**

O fígado é um órgão com capacidade de regeneração no indivíduo adulto já bem conhecida. Após hepatectomia parcial, os hepatócitos que se encontram normalmente quiescentes no parênquima entram em proliferação e através de um mecanismo de hiperplasia compensatória recuperam a massa hepática perdida<sup>9</sup>. Lesões por agentes agressores também podem ser reparadas pelos hepatócitos, a depender da sua extensão. Estes processos de reparo envolvem a proliferação e a diferenciação tanto de células residentes quanto de células que migram da circulação para o fígado. No entanto, é bastante claro que, em determinadas situações, sobretudo quando os mecanismos agressores comprometem a capacidade proliferativa das células hepáticas, o processo de regeneração do fígado é insuficiente para manter a funcionalidade do órgão.

Embora os hepatócitos possam adquirir capacidade proliferativa e participar do processo de reparo, tem se tomado cada vez mais evidente a contribuição de células-tronco na regeneração hepática após certos tipos de lesão onde a proliferação dos hepatócitos é inibida<sup>35</sup>. Sendo assim, é possível que terapias celulares visando à ativação ou amplificação de processos de regeneração naturais do organismo possam reverter ou prevenir o desenvolvimento de falência hepática. Neste capítulo descreveremos as bases experimentais do uso de células-tronco em terapias para doenças hepáticas e as perspectivas de aplicações clínicas destas células.

## **Doenças hepáticas como alvo de terapias celulares**

As principais doenças do fígado podem ser classificadas, de acordo com sua etiologia, em doenças virais (causadas pelos vírus hepatotrópicos), tóxicas (medicamentosas ou não), incluindo a doença alcoólica do fígado, doenças metabólicas e auto-imunes. Potencialmente, as terapias com células-tronco poderão ser empregadas para o tratamento de pacientes com insuficiência hepática crônica ou aguda já estabelecida, ou em casos com grande probabilidade de evolução para as mesmas.

- **Doenças crônicas do fígado**

O fígado é um órgão que pode ser alvo da agressão por vários agentes etiológicos. As conseqüências histológicas dessa agressão são a inflamação, a necrose hepatocelular e o desenvolvimento de fibrose. A fibrose hepática é um fator determinante de morbidade e mortalidade na doença hepática. As doenças crônicas do parênquima hepático em geral são caracterizadas por vários estágios de fibrose, sendo o estágio mais avançado denominado de cirrose. A cirrose hepática é caracterizada, histologicamente, por fibrose difusa que leva ao desarranjo da arquitetura lobular do fígado e à formação de nódulos regenerativos anormais. Dessa forma, os hepatócitos funcionais são substituídos por matriz extracelular não-funcional e perdem suas relações normais com estruturas vasculares<sup>37</sup>.

Em outros órgãos, como a pele, a reação fibrótica é interpretada como algo positivo onde a formação da cicatriz contribui para o fechamento da lesão. Entretanto, no fígado o mesmo processo compromete a arquitetura hepática e pode levar à disfunção do órgão. A função hepática habitualmente permanece preservada nos estágios iniciais de fibrose hepática e mesmo quando o paciente desenvolve cirrose, entretanto, à medida que a cirrose se torna mais intensa e mais hepatócitos são destruídos o órgão pode deixar de exercer as suas funções de forma adequada, ocorrendo então a insuficiência hepática crônica. A insuficiência hepática crônica, portanto, é o resultado final de uma agressão contínua ao fígado, durante vários anos ou décadas, que levará a um conjunto de sintomas e sinais clínicos característicos e que, se não tratada, levará ao óbito.

Uma vez estabelecida a cirrose hepática e persistindo a perda de massa funcional hepática, o órgão poderá perder a capacidade de exercer as suas funções básicas, caracterizando a insuficiência hepática crônica, o que levará ao surgimento de um conjunto de sintomas e sinais clínicos. A disfunção hepática termina por provocar também alterações em outros órgãos.

- **Insuficiência hepática aguda**

A insuficiência hepática aguda (IHA) caracteriza-se por ser uma síndrome clínica com elevado índice de mortalidade resultante de um súbito e extenso dano hepatocelular e conseqüente disfunção do órgão. Os termos insuficiência hepática fulminante e hepatite fulminante são freqüentemente utilizados como sinônimos de insuficiência hepática aguda<sup>31</sup>.

A etiologia da insuficiência hepática aguda fulminante pode ser variada. A hepatite aguda viral é a principal causa na maioria das regiões em todo o mundo. O vírus da hepatite A e B são os agentes responsáveis mais importantes, embora o vírus da hepatite C, D, E e vírus não-A-E também possam desencadear o quadro. Diversas drogas e toxinas, da mesma forma, podem provocar um quadro de hepatite fulminante. Entre elas destaca-se o analgésico paracetamol, que, quando utilizado em doses excessivas pode levar à necrose hepática maciça, e drogas usadas para a terapia da tuberculose, como isoniazida e rifampicina, que podem estar associadas a reações idiosincráticas. Entretanto, vários outros medicamentos utilizados freqüentemente, podem, potencialmente, levar à necrose maciça do fígado. Doenças metabólicas e autoimunes hepáticas fígado também são fatores etiológicos importantes<sup>2, 22,23, 25</sup>.

Dentre as alterações clínicas, o edema cerebral é freqüente, sendo uma causa importante de mortalidade. A maioria dos pacientes desenvolve disfunção pulmonar, insuficiência renal, coagulopatia, infecções e complicações metabólicas, como hipoglicemia, distúrbio hidro-eletrolítico e ácido-básico. A história natural da doença demonstra que o paciente evoluiu ou para a cura com recuperação total da função hepática, ou para a morte em poucos dias<sup>27</sup>.

- **Tratamento de insuficiência hepática**

O transplante hepático é o único tratamento eficaz para os pacientes com insuficiência hepática crônica ou aguda (em casos em que não há recuperação espontânea). Embora o fígado seja um órgão de baixa rejeição imunológica, todo transplante de órgão é um procedimento de risco que acarreta o uso de drogas imunossupressoras para o resto da vida dos indivíduos transplantados. No entanto, a disponibilidade de órgãos para a realização do transplante pode ser um fator limitante para o tratamento de

pacientes com insuficiência hepática, sobretudo em países onde a captação de órgãos não é eficaz o suficiente para suprir a demanda, como o Brasil, além de ser um procedimento de alto custo. Deste modo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para melhorar a função hepática e a qualidade de vida dos indivíduos é de grande relevância.

## **Células-tronco e regeneração hepática**

### **Terapia com células-tronco em modelos animais**

A aplicação terapêutica de células-tronco de várias origens vem sendo investigada nos últimos seis anos, utilizando diversos modelos de doenças hepáticas. De um modo geral, observou-se aceleração do processo de regeneração tecidual, resultando em melhora da função hepática e aumento da sobrevivência dos animais após tratamento com células-tronco (Tabela 1). Os mecanismos envolvidos no processo de regeneração são ainda muito discutidos, e podem variar de acordo com o mecanismo da doença. Até o momento, já foram testadas terapias utilizando diferentes tipos de células-tronco e fatores de crescimento capazes de atuar nas células-tronco (Fig. 1). Descreveremos a seguir as principais observações realizadas em modelos animais em que a terapia celular foi investigada.

→ **Entra Figura 1**

- **Células-tronco embrionárias**

As células-tronco embrionárias podem permanecer indiferenciadas e proliferar indefinidamente *in vitro*, enquanto mantêm o potencial de diferenciação em tipos celulares derivados dos três folhetos germinativos<sup>47</sup>. Estudos recentes têm demonstrado que estas células podem se diferenciar em hepatócitos<sup>12,17</sup>, constituindo, assim, uma fonte em potencial para terapias de doenças hepáticas.

Até o momento, poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o potencial terapêutico destas células. Alguns experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstram a capacidade de diferenciação das células-tronco embrionárias e de corpos embriões em hepatócitos ou em células que

expressam marcadores de hepatócitos, produtoras de albumina. Contudo, um efeito adverso da administração destas células embrionárias foi observado, que é a formação de teratocarcinomas<sup>5</sup>. Resultados semelhantes foram relatados por Choi (2002)<sup>6</sup> e Yamada (2002)<sup>50</sup>. Células hepáticas estabelecidas a partir de culturas de células-tronco embrionárias de rato transplantadas em baço de ratos hepatectomizados (90% de hepatectomia) prolongaram a sobrevivência dos mesmos<sup>39</sup>. Portanto, embora estas células possam ter aplicações terapêuticas futuras, a realização de estudos que permitam a sua utilização de forma segura em estudos clínicos é necessária, não apenas para o tratamento de doenças hepáticas.

- **Medula óssea**

O transplante de células de medula óssea autóloga apresenta-se como uma opção na medicina regenerativa, pois é um procedimento já bem estabelecido na prática médica. Vários modelos animais de doenças hepáticas têm sido utilizados para investigar o potencial terapêutico das células de medula óssea.

Camundongos deficientes da enzima fumarilacetoacetato hidrolase (Fah) que desenvolvem uma doença fatal semelhante à tirosinemia tipo I, têm sido utilizados como modelo de doença hepática metabólica. Lagasse e cols (2000)<sup>21</sup> demonstraram que a injeção intravenosa de células de medula óssea preveniu a morte dos animais através da restauração da função hepática. As células transplantadas geraram hepatócitos produtores de Fah em nódulos hepáticos, repovoando o fígado com células de origem da medula óssea. Estes resultados foram confirmados por Vassilopoulos e cols (2003)<sup>44</sup> e Wang e cols (2003)<sup>46</sup>. Nestes dois estudos, os autores concluíram que o principal mecanismo de geração de hepatócitos a partir de células da medula óssea é a fusão celular.

Outro modelo bastante utilizado é o de lesão hepática por administração de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), que induz necrose hepatocelular e acúmulo de tecido fibroso de modo dose e tempo-dependentes, sendo o rato uma espécie mais susceptível ao desenvolvimento da cirrose do que camundongos<sup>40</sup>. Jang e cols (2004)<sup>15</sup> demonstraram que uma população purificada de células-tronco da medula



óssea tem potencial de trans-diferenciação em células hepáticas *in vitro* e *in vivo*, ao contrário do que foi relatado nos estudos no modelo de camundongos Fah. O transplante destas células causou melhora funcional em camundongos com lesão hepática aguda induzida pela administração de CCl<sub>4</sub>. Sakaida e cols (2004)<sup>34</sup> também observaram melhora da função hepática, diminuição do percentual de tecido fibroso e aumento da sobrevivência em camundongos tratados com células da medula óssea por via intravenosa após lesão aguda pela administração de CCl<sub>4</sub>, e sugerem que ocorre trans-diferenciação das células injetadas em hepatócitos.

Em nossos estudos utilizamos um modelo de cirrose hepática induzida em camundongos pela administração crônica de CCl<sub>4</sub> associado ao álcool etílico e de fibrose periportal induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*. Foi observado que a infusão de células mononucleares da medula óssea promoveu a redução do tecido fibroso e um aumento da sobrevivência dos animais (Fig. 2A e B). A presença de hepatócitos com origem nas células transplantadas foi detectada dois meses após o tratamento (Fig. 2 C).

Os estudos citados acima são concordantes quanto ao efeito terapêutico benéfico da infusão de células da medula óssea. No entanto, há uma divergência quanto ao mecanismo responsável pela geração de novos hepatócitos, possivelmente devida a diferenças nos modelos de doenças hepáticas empregados, assim como nos métodos de investigação destes fenômenos. É possível que tanto a fusão quanto a trans-diferenciação ocorram em maior ou menor grau, a depender dos estímulos presentes no tecido hepático e dos tipos celulares transplantados.

→ **Entra Figura 2**

- **Células mesenquimais**

Uma fração das células do estroma de medula óssea, chamadas de células mesenquimais, tem sido foco de estudos em medicina regenerativa pelo seu potencial de diferenciação e efeitos terapêuticos já bem caracterizados em diversos modelos de doenças degenerativas<sup>4</sup>. Culturas de células-tronco mesenquimais humanas também podem gerar células com fenótipo de células hepáticas, em condições apropriadas de cultura,

indicando a possibilidade de utilização destas células no tratamento de pacientes com doenças hepáticas<sup>26</sup>.

O potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais de medula óssea foi primeiramente testado em modelo de lesão hepática aguda em camundongos injetados com CCl<sub>4</sub><sup>8</sup>. A injeção de células mesenquimais singênicas imediatamente após a administração de CCl<sub>4</sub> reduziu o dano hepático e a deposição de fibrose, e acelerou a regeneração hepática. Porém, não foi observada melhora quando as células foram injetadas uma semana após a indução de lesão. Observou-se correlação entre a diminuição de colágeno e dos níveis do fator de crescimento tumoral (TGF-β), uma citocina fibrosante, nos animais tratados com células mesenquimais imediatamente após desafio com CCl<sub>4</sub>. Células hepáticas com núcleo das células transplantadas (de doadores machos) foram identificadas em secções de fígado dos receptores (fêmeas), porém em baixa frequência.

O tratamento com células mesenquimais de medula óssea em modelo de fibrose hepática em ratos também teve efeitos benéficos<sup>52</sup>. As lesões hepáticas foram induzidas pela administração de CCl<sub>4</sub> ou de dimetilnitrosamina (DMN), e as células foram injetadas por via intravenosa, em diferentes tempos após o início da indução de lesão hepática. Os autores observaram uma redução na mortalidade, diminuição da perda de peso, diminuição da deposição de colágeno e melhora de parâmetros bioquímicos indicadores de disfunção hepática. O tratamento mais precoce teve melhores efeitos no progresso da doença.

Oyagi e colaboradores (2006)<sup>28</sup> investigaram o potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais cultivadas ou não na presença do fator de crescimento de hepatócitos (HGF) em um modelo experimental de lesão hepática induzida pela administração de CCl<sub>4</sub> em ratos. Neste estudo, observou-se que somente o tratamento por via intraperitoneal com células mesenquimais cultivadas na presença de HGF causou uma melhora significativa da função hepática (diminuição de alterações nos níveis de albumina e transaminases) e diminuição da fibrose.

A administração de células-tronco mesenquimais marcadas com partículas de ferro na veia porta de ratos com lesão hepática induzida pela administração de CCl<sub>4</sub> permitiu a demonstração, através da análise de

imagem por ressonância magnética, de que estas células podem ser detectadas no fígado até 12 dias pós-injeção<sup>3</sup>.

- **Células de cordão umbilical**

O sangue de cordão umbilical é também uma rica fonte de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, e, por ser uma população de células jovens, pode trazer vantagens em relação a outros tipos de células-tronco adultas quanto a aplicação em medicina regenerativa. O sangue de cordão umbilical contém células com o potencial de diferenciação *in vitro* em células com fenótipos de hepatócitos, indicando que esta pode ser uma fonte de células-tronco para o tratamento de lesões hepáticas<sup>13,18</sup>. Kang e colaboradores (2005)<sup>19</sup> demonstraram também a diferenciação de células-tronco mesenquimais do sangue de cordão umbilical *in vitro* pela cultura na presença do fator de crescimento de fibroblasto-4 (FGF-4) e de HGF.

Di Campli e colaboradores (2004)<sup>7</sup> investigaram o potencial terapêutico de células do sangue de cordão umbilical humano em um modelo de lesão hepática causada pela administração de álcool alílico em camundongos imunodeficientes NOD/SCID. Células mononucleares do sangue de cordão foram injetadas por via intraperitoneal, após indução de lesão hepática. Os autores observaram que as células-tronco humanas se diferenciaram em hepatócitos e causaram melhora da função hepática e aumento de sobrevivência dos animais. Resultados similares foram obtidos por Tang e colaboradores (2003)<sup>41</sup>, em modelo de insuficiência hepática aguda induzida pela administração de tetracloreto de carbono em ratos. Neste estudo, os animais que receberam injeção intraperitoneal de sangue de cordão umbilical três dias após a administração de CCl<sub>4</sub> tiveram uma melhora significativa da função hepática e conseqüentemente um aumento da sobrevivência. A observação de cortes histológicos do fígado dos animais após cinco dias de tratamento indicou um aumento da regeneração tecidual e diminuição de necrose hepatocelular e do número de células inflamatórias.

Piscaglia e cols (2005)<sup>30</sup> demonstraram que a infusão de células do sangue de cordão umbilical em ratos com lesão hepática induzida pela administração de álcool alílico causou aumento do processo de regeneração hepática. Neste estudo, os autores demonstraram, pela técnica de

microarray, a expressão aumentada de 265 genes e diminuída de 149 genes após a terapia celular. Entre estes estão incluídos genes de regulação de proliferação, diferenciação, adesão e migração celular, além de genes envolvidos na ativação de células ovais.

- **Células-tronco hepáticas**

Células-tronco teciduais seriam, em teoria, as células de escolha para o tratamento de lesões em um determinado tecido pelo seu provável comprometimento com as linhagens celulares residentes. As células ovais são um tipo de células-tronco hepáticas já bem caracterizadas, com potencial de diferenciação em hepatócitos e células do ducto biliar<sup>29</sup>. Wang e colaboradores (2003)<sup>45</sup> investigaram o potencial de regeneração hepático de células ovais em camundongos deficientes na enzima Fah. Células ovais foram isoladas do fígado de camundongos selvagens e injetadas em animais deficientes por via intraesplênica. A injeção de células ovais foi tão eficiente ou mais na repopulação do fígado degenerado pela deficiência em Fah do que a injeção de hepatócitos maduros. No modelo experimental de lesão hepática pelo tratamento com uma droga inibidora de proliferação de hepatócitos (monocrotalina) e submissão à hepatectomia parcial, foi testada uma terapia utilizando células ovais transfectadas com vetor codificando para anti-tripsina  $\alpha 1$ , um inibidor de serina protease, e da proteína fluorescente verde (GFP)<sup>38</sup>. Foi observada a presença de células hepáticas expressando esses marcadores correspondendo a 40-50% das células regeneradas no parênquima hepático 18 semanas após a terapia. Este estudo demonstra a possibilidade de utilização terapêutica de células-tronco como vetores para terapia gênica, de especial importância para tratamento de doenças causadas por defeitos genéticos.

Outra população de células-tronco residentes no fígado adulto de camundongos, com propriedade de exclusão de Hoescht (*side population*), foi investigada quanto ao seu potencial de regeneração hepática. Hussain e colaboradores (2005)<sup>14</sup> isolaram células-tronco de tecido não-parenquimatoso do fígado de cadáveres pela propriedade de exclusão de Hoechst 33342, que tinham potencial de geração de colônias em meio de indução de diferenciação hepática. As células geradas em cultura apresentavam

morfologia semelhante a hepatócitos e expressavam marcadores antigênicos e moleculares característicos deste tipo celular. Wulf e colaboradores (2003)<sup>48</sup> demonstraram que estas células-tronco contribuem para a formação de hepatócitos e células do ducto biliar em um modelo de lesão hepática por 3,5 dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolina (DDC) em camundongos.

- **Fatores de crescimento**

Uma alternativa para a utilização de células-tronco em regeneração hepática é a ativação de células residentes ou o recrutamento de células-tronco através da administração de hormônios celulares. Um fator mobilizador de células hematopoiéticas já utilizado na prática clínica é o fator estimulador de formação de colônias de granulócitos (G-CSF). Quintana-Bustamante e colaboradores (2006)<sup>32</sup> demonstraram que a utilização de G-CSF em camundongos com lesão hepática induzida pela administração de CCl<sub>4</sub> ou em animais deficientes de Fah aumentou a formação de hepatócitos derivados de células da medula óssea. A administração de G-CSF em lesões agudas e crônicas por CCl<sub>4</sub> em camundongos induziu a melhora das lesões hepáticas e o aumento do processo de regeneração, correlacionados à presença de hepatócitos originários das células mobilizadas e ao aumento da proliferação de hepatócitos<sup>51</sup>.

Outro hormônio celular com potencial utilização no tratamento de doenças hepáticas é o HGF. Em modelo de fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar em camundongos, a terapia por administração de plasmídeo contendo o gene do HGF causou a melhora das lesões hepáticas e a redução da fibrose, da produção de TGF- $\beta$  e de alterações na membrana basal do epitélio do ducto biliar<sup>49</sup>.

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) estimula a produção de HGF e inibe a produção de TGF- $\beta$  pelas células hepáticas estreladas<sup>36</sup>. O potencial terapêutico do IGF-1 foi testado no modelo de cirrose induzida pela administração de CCl<sub>4</sub> em ratos<sup>24</sup>. Neste estudo, observou-se uma diminuição do colágeno no fígado e da pressão portal dos animais cirróticos tratados com este hormônio celular.

→ **Entra Tabela 1**

## **Estudos clínicos**

Ao contrário de outras áreas, como na cardiologia ou neurologia, poucos estudos clínicos envolvendo terapias com células-tronco para pacientes com doenças do fígado já foram relatados até o momento. As fontes de células-tronco com maior potencial de utilização imediata são a medula óssea e o sangue de cordão umbilical, uma vez que estes já são utilizados na prática médica há décadas, tendo-se, portanto, experiência de manipulação e segurança quanto à sua utilização. Além dos trabalhos em modelos experimentais que demonstram o potencial terapêutico das células-tronco de medula óssea em lesões hepáticas, a observação da ocorrência de quimerismo (presença de células tanto de origem do doador quanto do receptor) no fígado após transplante de células de medula óssea de doadores do sexo masculino para mulheres indica que estas células podem contribuir para a regeneração hepática também em seres humanos<sup>1,20, 43</sup>.

Um ensaio clínico de terapia com células-tronco do sangue de cordão umbilical foi realizado por Tang e colaboradores (2003)<sup>41</sup>. Neste estudo, 153 pacientes com hepatite viral e disfunção hepática grave foram alocados randomicamente em diferentes grupos, sendo testados os efeitos da infusão de células do sangue de cordão umbilical combinada ou não à troca de plasma. A terapia com sangue de cordão umbilical consistiu da administração de 200 ml de sangue por via intravenosa, de uma a três vezes por semana, durante duas a quatro semanas. Os efeitos terapêuticos foram determinados através do monitoramento da função hepática em diferentes tempos de tratamento. Foi observada uma melhora significativamente maior na função hepática (diminuição dos níveis de bilirrubina e aumento dos níveis de albumina e do tempo de protrombina) nos grupos tratados com sangue de cordão umbilical, sobretudo quando associado à troca de plasma. Além disso, os autores não observaram efeitos adversos à infusão de células de cordão.

Ensaio clínico de fase I utilizando células-tronco de medula óssea no tratamento de pacientes com doenças crônicas do fígado estão em andamento no Japão<sup>42</sup> e no Brasil. Em nosso estudo realizado na Bahia, pacientes com cirrose hepática por várias etiologias, em lista de transplante de fígado, foram submetidos à infusão de células-tronco autólogas da medula

óssea (fração mononuclear) na artéria hepática, através de um cateter. Até o momento não foram observados efeitos adversos da terapia nos pacientes tratados com células da medula óssea. A realização de outros estudos será necessária para determinar a eficácia desta terapia.

A terapia por mobilização de células-tronco da medula óssea pela administração de G-CSF (5 µg/kg de peso, por três dias consecutivos) já foi testada em oito pacientes com cirrose crônica avançada (escala de Child B e C), em um estudo clínico de fase I<sup>10</sup>. Após um seguimento de oito meses, foi observado que a administração de G-CSF é segura e causou a mobilização de células de medula óssea que expressam marcadores de células epiteliais e de células-tronco. Embora este seja um estudo preliminar, os autores relataram uma melhora clínica nos pacientes tratados (menor incidência de encefalopatia e ascite) e queda na escala de MELD, na qual a mediana inicial era de 17,5 (11-20) e passou para 14,5 (9-20). Houve uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a melhora na classificação de Child e de MELD e o número de células mobilizadas pela administração do G-CSF.

Gordon e colaboradores (2006)<sup>11</sup> relataram recentemente um estudo clínico de fase I no qual foi investigada a segurança da infusão de células-tronco CD34+ mobilizadas pela administração por G-CSF. Os autores se basearam na observação de que uma fração de células CD34+ mobilizadas por G-CSF (99% das células da fração aderente em placa de cultura) da medula óssea autóloga de pacientes com insuficiência hepática expressam marcadores hepáticos e hematopoiéticos, dentre outros, e que podem, portanto, ter efeito terapêutico. Cinco pacientes com insuficiência hepática foram tratados com células CD34+ obtidas após mobilização com G-CSF e leucoferese, através de injeção na veia porta (em três pacientes) ou na artéria hepática (em dois pacientes). Não foi observado nenhum efeito adverso da terapia após dois meses de seguimento. Embora os resultados sejam ainda preliminares, os autores relataram a diminuição dos níveis de bilirrubina em três dos cinco pacientes e o aumento dos níveis de albumina em quatro dos cinco pacientes, sugerindo uma melhora da função hepática.

Embora não haja ainda relatos de ensaios clínicos utilizando outros tipos de células-tronco, é possível que esses tenham uma maior eficácia

terapêutica. Neste sentido, é interessante o relato de um caso de hepatite viral em uma mulher que teve gestações anteriores à doença hepática, cujo fígado apresentou quimerismo materno-fetal<sup>16</sup>. A análise de biópsias do fígado desta paciente demonstrou um número considerável de hepatócitos de origem fetal, sugerindo que células-tronco originadas do feto permaneceram no organismo materno e contribuíram para regeneração do fígado lesado.

### **Perspectivas**

Muito embora estejamos vivenciando apenas o início desta nova área da medicina, os resultados já obtidos em modelos animais indicam que a terapia com células-tronco tem um grande potencial no tratamento de doenças hepáticas agudas e crônicas. Várias questões precisam ainda ser respondidas, tais como o melhor tipo de células-tronco para aplicação em cada patologia, os melhores tempo e via de administração, a dose e o número de aplicações mais eficazes para cada patologia. Além disso, apesar de até então não terem sido relatados efeitos adversos das terapias investigadas, um acompanhamento mais extenso é necessário para determinar a segurança da terapia celular à longo prazo. É possível, ainda, que este tipo de terapia seja substituído ou associado à administração de hormônios celulares capazes de ativar as próprias células do paciente para reparo do fígado lesado, trazendo maiores benefícios e possivelmente tomando o procedimento menos invasivo. Por fim, o tratamento de doenças genéticas e talvez de determinadas patologias requererá a modificação genética de células-tronco do próprio paciente para utilização destas como vetores para terapia gênica.



## Referências

1. Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406(6793): 257, 2000.
2. Bernuau J, Goudeau A, Poynard T, Dubois F, Lesage G, Yvonnet B, Degott C, Bezeaud A, Rueff B, Benhamou JP. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology* (6): 648-51, 1986.
3. Bos C, Delmas Y, Desmouliere A, Solanilla A, Hauger O, Grosset C, Dubus I, Ivanovic Z, Rosenbaum J, Charbord P, Combe C, Bulte JW, Moonen CT, Ripoche J, Grenier N. In vivo MR imaging of intravascularly injected magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidney and liver. *Radiology* 233(3), 781-9: 2004.
4. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 2006, *in press*.
5. Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Aii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 36(1):22-9, 2002.
6. Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, Lee JD, Yeoh GC, Shin HS, Lee JS, Oh B. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplantation* 11 (4): 359-68, 2002.

7. Di Campi C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 36(9):603-13, 2004.
8. Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 78(1): 83–8, 2004
9. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 43 (2 Suppl 1): 45-53, 2006
10. Gaia S, Smedile A, Omede P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, Abate ML, Marzano A, Rizzetto M, Tarella C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006, *in press*.
11. Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M'hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davis J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA. Characterisation and clinical application of human cd34+ stem/progenitor cell populations mobilised into the blood by G-CSF. *Stem Cells*. 2006, *in press*.
12. Hamazaki T, Itoh Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Tarada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FESB Letters* 497(1): 15-9, 2001.
13. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-

- derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330(4):1153-61, 2005.
14. Hussain SZ, Strom SC, Kirby MR, Burns S, Langemeijer S, Ueda T, Hsieh M, Tisdale JF. Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig Dis Sci* 50(10):1755-63, 2005.
  15. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 6(6):532-9, 2004.
  16. Johnson KL, Samura O, Nelson JL, McDonnell M d WM, Bianchi DW. Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* 36(5): 1295-7, 2002.
  17. Jones EA; Tosh D; Wilson DI; Lindsay S; Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Experimental Cell Research* 272(1): 15-22, 2002.
  18. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Aii S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 21(2): 217-227, 2003.
  19. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 11(47):7461-5, 2005.
  20. Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin

- in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346(10):738–46, 2002.
21. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Méd* 6(11):1229-34, 2000.
22. Larrey D, Pageaux GP. Drug-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17(2):141-3, 2005.
23. Lee WM. Acute liver failure. *Am J Med* 96(1A):3S-9S, 1994.
24. Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R, Martinez-Chantar ML, Martinez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J. Insulin-like growth factor-I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut*. 2006, *in press*.
25. O'Grady JG. Paracetamol-induced acute liver failure: prevention and management. *J Hepatol* 26 (1):41-6, 1997.
26. Ong SY, Dai H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials*. 27(22):4087-97, 2006.
27. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, McCashland TM, Shakil AO, Hay JE, Hynan L, Crippin JS, Blei AT, Samuel G, Reisch J, Lee WM. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 137(12):947-54, 2002.
28. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated

- bone marrow mesenchymal cells into CCl<sub>4</sub>-injured rats. *J Hepatol* 44(4):742-8, 2006.
29. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 27(2):433-45, 1998.
30. Piscaglia AC, Zocco MA, Di Campli C, Sparano L, Rutella S, Monego G, Bonanno G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. How does human stem cell therapy influence gene expression after liver injury? Microarray evaluation on a rat model. *Dig Liver Dis* 37(12):952-63, 2005.
31. Polson J, Lee WM. American Association for the study of liver disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 41(5):1179-97, 2005.
32. Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* 43(1):108-16, 2006.
33. Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 38(4):197-202, 2005.
34. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40(6):1304-11, 2004.
35. Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson SS, Bisgaard HC. Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* 113(11-12):876-902, 2005.

36. Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodriguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, Fuller CR, Simmons JG, Pardo A, Martinez-Chantar ML, Fagin JA, Prieto J. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 54(1):134-41, 2005.
37. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins *Semin Liver Dis* 10(1):1-10, 1990.
38. Song S, Witek RP, Lu Y, Choi YK, Zheng D, Jorgensen M, Li C, Flotte TR, Petersen BE. Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice. *Hepatology* 40(4):918-24, 2004.
39. Tabei I, Hashimoto H, Ishiwata I, Tachibana T, Akahori M, Ohi S, Kubo H, Satou K, Yamazaki Y, Yanaga K, Ishikawa H. Characteristics of hepatocytes derived from early ES cells and treatment of surgically induced liver failure rats by transplantation. *Transplant Proc* 37(1):262-4, 2005.
40. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl<sub>4</sub> an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 3(1): 112-20, 1983.
41. Tang XP, Yang X, Tan H, Ding YL, Zhang M, Wang WL. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 9(9):1999-2003, 2003.
42. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/ CCl<sub>4</sub> model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12(3):203-7, 2005.

43. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32(1):11–6, 2000.
44. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422(6934):901–4, 2003
45. Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci* 30, 100(1):11881–8, 2003.
46. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422(6934):897–901, 2003.
47. Wobus AM, Boheler KR: Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85(2): 635–78, 2005.
48. Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 88(4):368–78, 2003.
49. Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 168(5):1500–12, 2006.
50. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 20(2):146–54, 2002.

51. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 33(1):108-19. 2005
  
52. Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 11(22):3431-40, 2005.



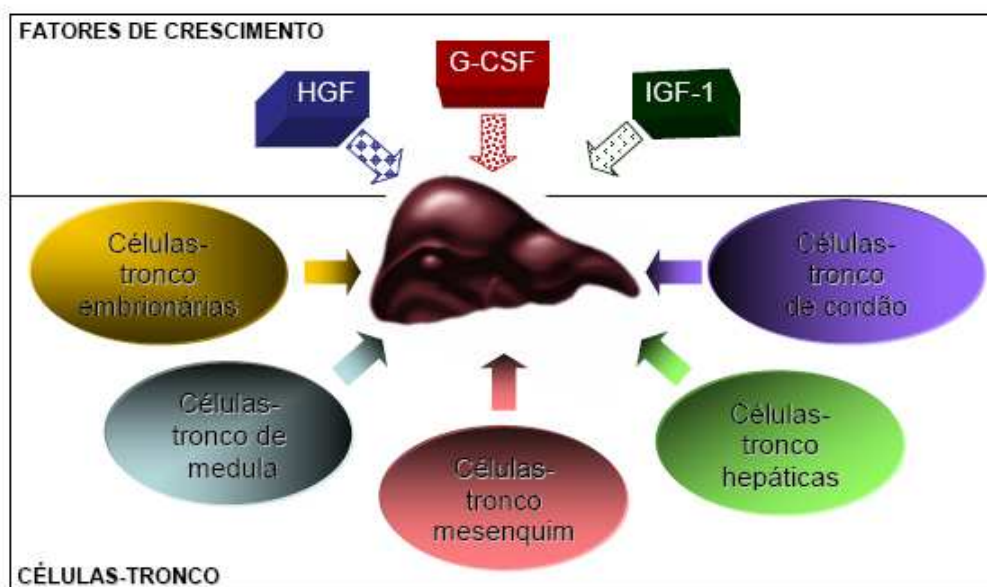
**Tabela 1: Efeitos da terapia com células-tronco ou fatores de crescimento em modelos de doenças hepáticas**

	<b>Alterações observadas após a terapia celular</b>
<b>Aspectos histopatológicos e bioquímicos</b>	
Fibrose	diminuída <sup>8,34,49,52</sup>
Regeneração hepática	aumentada <sup>14,51</sup>
Apoptose de hepatócitos	diminuída <sup>4</sup>
Inflamação	diminuída <sup>41</sup>
Hepatócitos gerados a partir de células transplantadas	Presentes em maior ou menor quantidade (por fusão ou transdiferenciação) <sup>7,15,34,44,46</sup>
Produção de TGFβ	diminuída <sup>8,49</sup>
Produção de HGF	aumentada <sup>30</sup>
Produção de metaloproteinases	aumentada <sup>30,33</sup>
Níveis séricos de bilirrubina	diminuído <sup>21,44</sup>
Níveis séricos de albumina	aumentado <sup>28</sup>
Tempo de protrombina	aumentado <sup>15</sup>
Níveis séricos de transaminases	diminuído <sup>21,28</sup>
Alterações na membrana basal do epitélio do ducto biliar	diminuída <sup>49</sup>
<b>Pressão portal</b>	diminuída <sup>52</sup>
<b>Perda de peso</b>	diminuída <sup>24</sup>
<b>Mortalidade</b>	diminuída <sup>7,34,41,52</sup>

Observações feitas em um ou mais estudos, conforme indicado.

**Figura 1: Terapias com células-tronco e fatores de crescimento em modelos experimentais de doenças hepáticas.** Células-tronco de diferentes fontes foram testadas em vários modelos experimentais e demonstraram efeitos terapêuticos. Fatores de crescimento como o HGF, o G-CSF e o IGF-1 também mostraram eficácia terapêutica, indicando que estes podem ser utilizados em associação com a terapia celular ou como terapia alternativa.

Figura 1



**Figura 2: Terapia com células-tronco de medula óssea no modelo de cirrose induzido por CCl<sub>4</sub> em camundongos.** Secções de figados obtidos de camundongos com lesão crônica induzida por CCl<sub>4</sub> dois meses após a injeção de salina, como controle (A), ou após o transplante de células mononucleares de medula óssea (B). Coloração por picosírius vermelho para visualização de fibrose. C, Imunofluorescência de secção de fígado de camundongo após dois meses de tratamento com células mononucleares de medula óssea de animal GFP. Marcação para albumina (vermelho) e núcleos corados com DAPI (azul). Presença de células co-expressando GFP e albumina (amarelo), caracterizando hepatócitos originados a partir de células da medula óssea transplantada. Objetiva de 10x (A e B) e de 40x (C).

Figura 2

