



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

VERUSKA CINTIA ALEXANDRINO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS CD11b⁺ EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA CRÔNICA**

Recife - 2013

VERUSKA CINTIA ALEXANDRINO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS CD11b⁺ EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA CRÔNICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal. Área de Concentração em
Morfofisiologia Animal**

Orientadora:

Prof^a. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof^a. Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Prof^o. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Recife - 2013

VERUSKA CINTIA ALEXANDRINO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS CD11b⁺ EM
MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO HEPÁTICA CRÔNICA**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal. Área de Concentração em
Morfofisiologia Animal**

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira (orientadora)

Prof^a. Dr^a. Sheilla Andrade de Oliveira – CPqAM / FIOCRUZ

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – UFRPE

Prof. Dr. Fábio A. Brayner dos Santos – LIKA / CPqAM

Aos meus pais que tanto amo, Hélio e Vera.

Ao meu amor, Victor Vasconcelos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e minha família;

Aos meus pais, Hélio e Vera, pelo amor, dedicação, estímulo e apoio incondicionais. São, com certeza, a mola propulsora de toda essa conquista;

Ao meu namorado, Victor Vasconcelos, pela compreensão, paciência, tolerância, cuidado, companhia e amor em tempo integral;

À Profa. Dra. Sheilla Andrade de Oliveira, pelo exemplo e incondicional amizade. Obrigada pela confiança e disponibilidade, e também por contribuir imensamente pelo meu crescimento intelectual, profissional e pessoal;

Aos Professores Dra. Valéria Wanderley Teixeira e Dr. Álvaro Aguiar C. Teixeira, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança depositada, pela atenção e pelo exemplo de conquistas;

Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela amizade, carinho e companheirismo: Roni Evêncio, Andréia Barros, Carolline Guimarães, Leyllane Moreira, Anekécia Lauro, Jamerson Oliveira, Antônio Sérgio, Edna Santiago e Camila Carvalho;

Aos colegas do Laboratório de Histologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela amizade e discussões que enriqueceram este trabalho;

À minhas amigas da pós-graduação: Laíse Souza, Danielle Dutra, Juliana Arandas, Sandra Souza pelo companheirismo durante toda essa jornada, e por estarmos juntas compartilhando alegrias e angústias. Adoro vocês meninas!

Aos amigos (que, por sorte, são muitos para serem mencionados aqui), pela amizade sincera, força, encorajamento e incentivo em todos os momentos;

Ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE, pelo conhecimento adquirido;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE), pela infraestrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho;

À FACEPE, pela bolsa de mestrado, que tornou possível a realização do trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial terapêutico de células CD11b⁺ de medula óssea em modelo experimental de cirrose. Camundongos C57BL/6 isogênicos receberam, durante seis meses, por via orogástrica, 200µL de uma solução de CCl₄ 20% diluído em azeite de oliva e etanol 5%. Após o estabelecimento da lesão, os animais foram submetidos à terapia com células CD11b⁺ de medula óssea, células mononucleares totais de medula óssea (CMMO), CMMO sem CD11b⁺ e salina. As células CD11b⁺ foram obtidas da camada mononuclear da medula óssea de camundongos C57BL/6, por separação imunomagnética. Dois meses após a terapia, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do fígado, para avaliações morfológicas, morfométricas, imunoistoquímicas e dosagem de hidroxiprolina. A caracterização celular por citometria de fluxo revelou que a fração obtida por esse método é constituída de população homogênea de monócitos. Dois meses após o transplante, as análises morfológicas, morfométricas e bioquímicas exibiram diminuição no percentual de fibrose, nos níveis de hidroxiprolina e aumento significativo no número de células de Kupffer no tecido hepático. Ensaio imunohistoquímico mostrou processos de proliferação celular e apoptose mais evidentes nos grupos que não receberam células CD11b⁺. Pôde-se concluir que, o método de obtenção das células CD11b⁺ é considerado viável e que o transplante destas células para fígados cirróticos é capaz de reduzir os níveis de fibrose, sugerindo possível aplicação terapêutica desta população celular no tratamento das hepatopatias crônicas.

Palavras-chave: fígado; terapia celular; imunohistoquímica; cirrose; células CD11b⁺

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the therapeutic potential of CD11b⁺ cells from bone marrow in experimental cirrhosis pattern. C57BL/6 inbred mice received during six months 200µL of 20% CCl₄ solution in ethanol 5%, by an orogastric pathway. After the lesion establishment, the animals underwent therapy with CD11b⁺ cells from bone marrow, bone marrow mononuclear cells (BMMC), BMMC without CD11b⁺ and saline. CD11b⁺ cells were obtained from bone marrow mononuclear layer of C57BL/6 mice by immunomagnetic separation. The cell characterization by flow cytometry revealed fraction obtained by this method consisting of homogeneous population of monocytes. Two months after transplantation, the morphological, biochemical and morphometric exhibited decrease in the percentage of fibrosis, hydroxyproline levels and a significant increase in the number of Kupffer cells in the liver tissue. Immunohistochemical assays showed both proliferation and apoptosis were most evident in groups that received no cells CD11b⁺. It was concluded that the method of obtaining of the cells CD11b⁺ is considered feasible and transplantation of these cells in cirrhotic livers are capable of reducing levels of fibrosis, suggesting possible therapeutic application of this cell population in the treatment of chronic liver disease.

Keywords: liver; cell therapy; immunohistochemistry; cirrhosis; CD11b⁺ cells.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1 - Processo de iniciação e a manutenção da fibrogênese	19
Figura 2 - Mecanismo de ação do CCl ₄ no tecido hepático	23
Figura 3 - Processo de hemopoiese que ocorre na medula óssea	25
Figura 4 – Mecanismos da terapia celular com CMMO no tecido hepático	27

Capítulo II

Figura 1 – Gráfico da imunofenotipagem por citometria de fluxo das CMMO CD11b ⁺ obtidas por separação imunomagnética para os marcadores CD11b e CD14.....	63
Figura 2 – Análise morfológica do tecido hepático dos grupos estudados, com presença de necrose hepatocelular (A, H-E, 200x), formação de nódulos regenerativos delimitados por tecido fibroso (B, sirius red, 100x), proliferação ductular (C, H-E, 200x), esteatose macrovacuolar e microvacuolar (D, H-E, 100x) e corpúsculo de Malory (E, H-E, 200x).....	64
Figura 3 - Gráfico do percentual de tecido fibroso dos grupos cirróticos tratados com salina, CMMO CD11b ⁺ , CMMO totais, CMMO sem CD11b ⁺ e grupo controle, dois meses após o transplante	65
Figura 4 – Gráfico da dosagem de hidroxiprolina dos animais cirróticos tratados com salina, CMMO CD11b ⁺ , CMMO totais, CMMO sem CD11b ⁺ e animais controle, dois meses após o transplante	65
Figura 5 – Ensaio de proliferação celular (PCNA) nos grupos experimentais: grupo cirrótico tratado com células CD11b ⁺ (A); grupo cirrótico tratado com CMMO totais (B); grupo cirrótico tratado com CMMO sem CD11b ⁺ (C); grupo cirrótico tratado com salina (D); e grupo controle (E)	66

Figura 6 – Imunohistoquímica para células em apoptose nos grupos experimentais: grupo cirrótico tratado com células CD11b⁺ (A); grupo cirrótico tratado com CMMO totais (B); grupo cirrótico tratado com CMMO sem CD11b⁺ (C); grupo cirrótico tratado com salina (D); e grupo controle (E) 67

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA – Alfa-actina de músculo liso

2-AAF - 2-acetilaminofluorano

ALT - Alanina transaminase

AST - aspartato transaminase

CCl₄ – Tetracloreto de carbono

CEH – Célula estrelada hepática

CMMO – Células mononucleares de medula óssea

CTA – Célula-tronco adulta

CTE – Célula-tronco embrionária

EGFP – Proteína fluorescente verde

ET-1 – Endotelina-1

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

HP – Hepatectomia parcial

IL - Interleucina

IPS – Célula-tronco pluripotente induzida

INF- γ – Interferon-gama

MACs – Separação magnética

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinase da matriz

NO – Óxido nítrico

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

ROs – Espécies reativas de oxigênio

TGF- β – Fator de crescimento e transformação – beta

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF- α – Fator de necrose tumoral–alfa

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores percentuais dos marcadores para as células obtidas por separação imunomagnética 68

Tabela 2 - Média ($\pm$ desvio-padrão) de Células de Kupffer e da contagem morfológica do parênquima lobular e não-lobular do fígado 68

SUMÁRIO

Capítulo		Pág.
1	1 INTRODUÇÃO.....	15
	2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
	2.1 Cirrose hepática	17
	2.2 Modelos experimentais de hepatopatias	21
	2.3 Terapias celulares	23
	2.4 Terapia celular com células de medula óssea em doenças hepáticas	26
	2.5 Monócitos e terapia celular	29
	3 REFERÊNCIAS.....	32
2	Efeitos terapêuticos de células CD11b ⁺ em modelo experimental de cirrose hepática	41
	1 RESUMO	42
	2 ABSTRACT	43
	3 INTRODUÇÃO	44
	4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
	4.1 Animais	45
	4.2 Grupos experimentais	46
	4.3 Indução de cirrose por intoxicação pelo tetracloreto de carbono	46
	4.4 Obtenção de CMMO totais e isolamento de células CD11b ⁺ de medula óssea	47
	4.5 Caracterização da população de células CD11b ⁺ por citometria de fluxo	47
	4.6 Infusão das células nos animais cirróticos	48
	4.7 Avaliação morfológica e morfométrica	48
	4.8 Dosagem de Hidroxiprolina	49
	4.9 Ensaio de proliferação celular	49
	4.10 Detecção de células apoptóticas pelo método de TUNEL	50

4.11 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Caracterização celular	51
5.2 Análises morfológica e morfométrica e dosagem de hidroxiprolina.....	51
5.3 Imunohistoquímica	52
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES.....	57
8 AGRADECIMENTOS.....	58
9 REFERÊNCIAS	58
10 FIGURAS E LEGENDAS	63
11 TABELAS.....	68
12 ANEXO	69
12.1 Certificado de aprovação Comitê de Ética	69

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas acometem milhões de pessoas, sendo responsáveis por um alto índice de atendimentos e internações hospitalares em todo o mundo (KUMAR; OATI; SARIN, 2011). A alta incidência observada nas enfermidades do fígado as caracterizam como um sério problema de saúde pública, que decorre devido a existência de diversos agentes etiológicos, tais como infecções virais dos tipos A (CUTBERT, 2001; TAYLOR et al., 2006), B (LOK; McMHON, 2007) e C (BOOTH; O'GRADY; NEUBERGER, 2001), infecções parasitárias (GRYSEELS et al., 2006), uso excessivo de álcool ou de outras substâncias tóxicas (LARSON et al., 2005) e até mesmo disfunções metabólicas e auto-imunes (KEEFFE, 2001). O aumento nos índices de morbimortalidade entre os pacientes portadores de hepatopatias tem demonstrado a necessidade de desenvolvimento de tratamentos mais efetivos que os atualmente existentes (IREDALE, 2003; BATALLER; BRENNER, 2005).

Em alguns casos, as doenças crônicas do fígado evoluem para a cirrose, podendo progredir para a forma descompensada e falência hepática (BATALLER; BRENNER, 2005). Nesse estágio da doença, o transplante de fígado torna-se a única terapia efetiva (IREDALE, 2007). Contudo, esse procedimento terapêutico é de alto risco e bastante invasivo, dificultado também pela baixa disponibilidade de órgãos pelo sistema de saúde. Cerca de 10 a 15% dos pacientes vão a óbito ainda na fila de espera por um transplante (LYRA et al., 2007). Além disso, a dependência do paciente transplantado por medicamentos imunossupressores e a probabilidade de uma possível rejeição ao novo órgão são fatores de risco que envolve o transplante (YAN et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que promovam uma diminuição das agressões teciduais decorrentes de lesões hepáticas crônicas e consequente reestabelecimento da função do órgão se faz necessário (LYRA et al., 2007).

Dentre as possíveis alternativas terapêuticas, a medicina regenerativa, através da terapia celular, ganha destaque (ALISON et al., 2009). O transplante celular oferece uma série de vantagens. Além de ser um procedimento pouco invasivo,

pode ser utilizado repetidamente se for necessário (BALDO et al., 2010). O uso de células-tronco no tratamento de doenças hepáticas vem apresentando resultados bastante animadores, e tal fato pode ser atribuído ao potencial de auto-renovação dessas células e sua capacidade de gerar outras linhagens celulares, proporcionando melhora tecidual (KÖRBLING; ESTROV, 2003).

O potencial terapêutico de várias populações celulares vem sendo investigado nos últimos anos. Atualmente, a medula óssea é considerada como uma das principais fontes de células utilizadas na terapia celular, de onde se pode obter uma fração purificada de células mononucleares (CMMO) (ZAGO; COVAS, 2006). Alguns trabalhos experimentais têm demonstrado melhora significativa da função hepática após transplante com CMMO (FANG et al., 2004; BELARDINELLI et al., 2008). Estudos clínicos também relataram melhora de pacientes cirróticos após terapia com CMMO (LYRA et al., 2007).

Apesar dos avanços obtidos em estudos de terapia com CMMO, ainda há controvérsias sobre a sua eficácia e os mecanismos que promovem a recuperação do órgão (HOULIHAN; NEWSOME, 2008). Trabalhos descrevem processos de fusão celular e transdiferenciação das células transplantadas em hepatócitos. No entanto, esses eventos ocorrem numa frequência muito baixa (inferior a 0,5%), sugerindo que tais mecanismos não são os únicos no processo regenerativo induzido pelo transplante celular (WANG et al., 2003; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2006). Pesquisas sugerem que a sinalização parácrina, mediada pelas células transplantadas, possa ter um papel relevante na recuperação do fígado, através da produção e liberação de citocinas mitóticas e anti-fibrogênicas (FANG et al., 2004; BRAGA et al., 2008).

Novos estudos capazes de identificar quais populações dentre a CMMO estão diretamente envolvidas na regeneração hepática são necessários. Uma das células que pode ter participação expressiva na melhora do órgão após o transplante de CMMO são os monócitos. Pesquisas demonstraram o potencial de diferenciação dessas células em hepatócitos e sua capacidade de sintetizar e secretar mediadores químicos capazes de contribuir para a melhora morfofisiológica do tecido hepático (RUHNKE et al., 2005; YAN et al., 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cirrose hepática

A cirrose é o resultado da evolução da maioria das lesões crônicas do fígado (BATALLER; BRENNER, 2005), caracterizada por um processo difuso de fibrose, com alteração da arquitetura hepática normal e formação de nódulos no parênquima, acompanhada por alterações na vascularização do fígado (SCHUPPAN; AFDHAL, 2009). Esse conjunto de eventos é diretamente responsável pela redução progressiva da função hepática (BATALLER; BRENNER, 2005). Os sinais clínicos da cirrose podem variar, desde pacientes com alterações laboratoriais isoladas em pacientes assintomáticos até casos de falência hepática completa (TSUKADA ; PARSONS; RIPPE, 2006).

A cirrose é considerada como um processo dinâmico que ocorre pela combinação de três mecanismos patológicos: Morte celular, fibrose e regeneração (ANTHONY; ISHAK, 1978). A lesão hepática, quando acontece de forma persistente e prolongada, induz a ativação de uma cascata de respostas inflamatórias e fibrogênicas (FORBES; PAROLLA, 2011). A deposição progressiva de tecido fibroso promove o isolamento do parênquima em ilhotas residuais de hepatócitos envolvidos por uma cápsula fibrótica, nomeadas de nódulos cirróticos, que podem variar de micronódulos (aproximadamente 3mm de diâmetro) a macronódulos (GUYOT et al., 2005). Os hepatócitos isolados por tecido fibroso, em resposta à necrose hepatocelular, desenvolvem mecanismos de proliferação, com a produção de novas células hepáticas, na tentativa de compensar a perda funcional decorrente da lesão (WANLESS; NAKASHIMA; SHERMAN, 2000).

O processo patogênético mais importante no desenvolvimento da cirrose é a fibrose. A fibrose é a consequência de uma reação crônica de cicatrização que ocorre em resposta às lesões persistentes, neste caso, à necrose hepatocelular (FORBES; PAROLLA, 2011). A fibrogênese hepática, independentemente da etiologia, é um evento resultante de processos moleculares, celulares e teciduais, dinâmicos e altamente integrados, que levam a uma deposição progressiva de componentes da matriz extracelular (MEC) (FRIEDMAN, 2008). A deposição excessiva de colágenos fibrilares, principalmente colágenos dos tipos I e III,

glicoproteínas e proteoglicanas, passam a preencher espaços que, anteriormente à lesão, eram ocupados por hepatócitos (TSUKADA; PARSONS; RIPPE, 2006; IREDALE, 2007). Essa fibrose é mantida principalmente pela ativação de células estreladas hepáticas (CEHs). Além das CEHs, outras células, de origem mesenquimal, estão envolvidas na fibrogênese, tais como miofibroblastos, fibroblastos intersticiais e células epiteliais do ducto biliar (BHUNCHET; WAKE, 1992; HERBST et al., 1997; RAMADORI; SAILI, 2004).

As CEHs são células perisinusoidais, que normalmente estão localizadas no espaço de Disse (IREDALE, 2007). Em condições normais, essas células encontram-se quiescentes, servindo como depósitos de ácido retinóico (ENG; FRIEDMAN, 2000; GEERTS, 2001). Porém, em um processo de dano tecidual, essas células são ativadas, perdem seus estoques de vitamina A e assumem fenótipo de miofibroblastos (células contráteis e altamente proliferativas) (MAHER et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1992). Essa ativação envolve uma série de mudanças, como um aumento da atividade mitótica das CEHs em áreas de fibrose, produção da proteína citoesquelética alfa-actina de músculo liso (α -SMA), com produção e deposição excessiva de componentes da MEC (FRIEDMAN, 2008), bem como a secreção de fatores de crescimento capazes de, não apenas manter, mas também perpetuar a fibrogênese, as respostas inflamatórias e a neo-angiogênese, através de sinalização parácrina e autócrina (FORBES; PAROLA, 2011).

A ativação e a proliferação das CEHs são mecanismos-chave no desenvolvimento da fibrose (KISSELEVA; BRENNER, 2011) como pode ser demonstrado na figura 1. Esses processos são resultantes da ação de mediadores pró-fibrogênicos, como o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β), a mais potente citocina envolvida na fibrogênese hepática (GONG et al., 1998); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o mitógeno mais atuante para CEHs (MARRA et al., 1994); e endotelina-1 (ET-1), que, secretada principalmente pelas células de Kupffer, hepatócitos, miofibroblastos, plaquetas e pelas próprias CEHs, aumenta ainda mais a produção de óxido nítrico (NO) (FALLON; ABRAMS, 2000; GRESSNER et al., 2002; KINNMAN; HOUSSET, 2002). Estudos também mostram que espécies reativas de oxigênio (ROs) exerçam influência direta nas CEHs, aumentando a produção de MEC. O desenvolvimento do stress oxidativo está estreitamente associado com a fibrose hepática (FORBES; PAROLLA, 2011). As

EROs podem ativar as células de Kupffer, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogências (ARENAS et al., 2004).

Durante as primeiras etapas de ativação, as CEHs produzem e liberam metaloproteinases da matriz (MMP), enzimas que degradam moléculas de colágeno (GRESSNER et al., 2002). Porém, quando essas células completam o seu ciclo de ativação, elas aumentam a síntese e a liberação de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) I e II, resultando numa queda da atividade das MMPs e consequentemente diminuição na degradação da matriz, promovendo o acúmulo de tecido fibroso (SHUPPAN et al., 2001).

Em virtude da importância das CEHs na fibrogênese hepática, bem como das características moleculares dessa população celular, acredita-se que o tratamento efetivo procura reduzir ou inibir os efeitos promovidos por CEHs ativadas, e que essas terapias podem ser direcionadas especificamente para essas células, evitando assim o comprometimento de outras populações celulares do fígado (KISSELEVA; BRENNER, 2011).

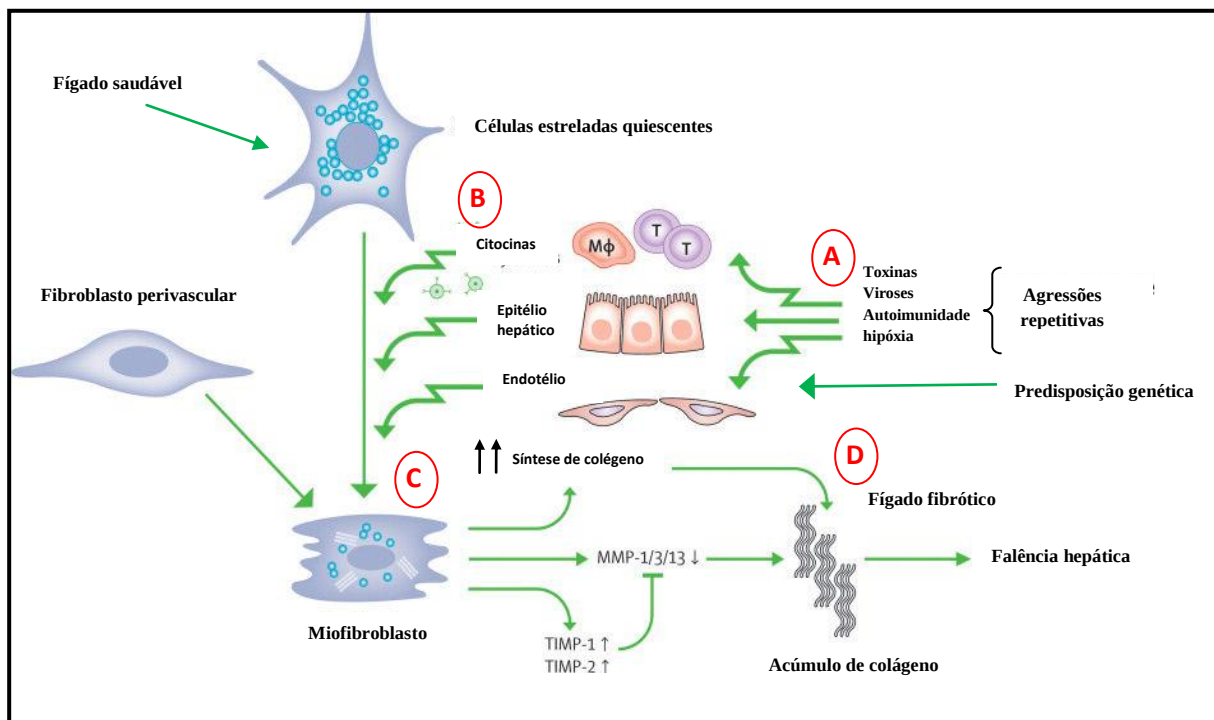


Figura 1: Ilustração que representa o processo de iniciação e a manutenção da fibrogênese. Agentes agressores de diversas etiologias atuam de forma repetitiva, promovendo uma resposta (A). A partir daí, uma cascata de citocinas liberadas por células de defesa e por células hepáticas residentes estabelecem a ativação de CEHs (B), que assumem fenótipo de miofibroblastos e passam a produzir

e secretar fibras colágenas em grandes quantidades (C). O acúmulo de colágeno resulta na fibrose hepática e sua progressão pode culminar na falência hepática (D). Fonte: Schuppan; Afdhal (2008).

Durante décadas acreditou-se que, a partir do momento em que a fibrose está estabelecida, tornaria-se irreversível (POPPER; KENT, 1975). Contudo a fibrogênese é um processo dinâmico potencialmente reversível (FRIEDMAN et al., 2013). A possibilidade de uma possível regressão ou reversibilidade de um quadro de fibrose foi levantada a partir de estudos experimentais, onde foi observado que a retirada do estímulo associada à terapias anti-fibróticas promoveu resultados promissores em hepatite C (ARTHUR, 2002). Várias moléculas vêm sendo constantemente identificadas como possíveis alvos para terapias anti-fibrogênicas. Sabe-se que o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) desempenha um papel fundamental na ativação de células estreladas. Embora os inibidores de TGF- β sejam efetivos em modelos experimentais de lesão de curto tempo, eles não são apropriados para terapias longas, por conta do papel significativo do TGF- β na homeostase e no reparo (SUBEQ et al., 2011). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) é uma citocina pleiotrópica produzida pelas CEH e requeridas na regeneração hepática e na fibrose. O tratamento com inibidores de HGF produz efeitos anti-fibrogênicos, mas também aumenta o risco de tumorigênese em camundongos (ARTEAGA; DUGGER; HURD, 1996; BAEK et al., 2010). Esses dados reforçam a importância de se desenvolver tratamentos mais efetivos e que ofereçam maior expectativa de vida aos pacientes cirróticos.

O desenvolvimento da cirrose está intimamente associado com a angiogênese (FERNÁNDEZ et al., 2009). Estudos mostram que a fibrose pode ser considerada um fator preponderante para a neovascularização hepática. A intensa deposição de tecido de cicatrização induz aumento na expressão de mediadores químicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e a angiopoeitina 1 e 2, contribuindo, assim, para o desenvolvimento da hipertensão portal, um dos processos que mais leva os pacientes cirróticos a óbito (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; YOSHIJI et al., 2003). Além disso, a hipóxia gerada durante o processo fibrogênico também está associada à formação de novos vasos (JIN et al., 2006). Evidências sugerem que a associação entre a angiogênese e a fibrose hepática é relevante para a avaliação da

progressão da doença e na busca por novos alvos terapêuticos (PINZANI et al., 2011).

2.2 Modelos experimentais de hepatopatias

Estudos experimentais são desenvolvidos com o objetivo de aprimorar os tratamentos existentes ou estabelecer novas terapias para várias doenças, inclusive enfermidades que acometem o fígado, servindo também como ferramenta para compreensão dos diversos mecanismos envolvidos na patogenia das lesões hepáticas. O desenvolvimento de modelos animais tem seguido três abordagens principais: procedimentos cirúrgicos (HIGGINS; ANDERSON, 1931), o uso de agentes infectantes (BOGLIOLO, 1957), e procedimentos farmacológicos (BOSMA et al., 1988).

Dentre os modelos cirúrgicos destaca-se o modelo descrito no trabalho de Higgins; Anderson (1931), conhecido como Hepatectomia parcial (HP). Trata-se de um procedimento invasivo que consiste na retirada de cerca de dois terços do fígado, correspondente aos lobos anteriores. Essa prática induz os lobos residuais a atuarem no processo de regeneração hepática, onde, num período de vinte dias, em média, o fígado recupera sua massa perdida, voltando a apresentar tamanho e volume normais. Isso ocorre devido à proliferação celular decorrente da ativação dos hepatócitos que se encontram quiescentes e que, em condições especiais, ativam sua habilidade proliferativa, fenômeno conhecido como Hiperplasia Compensatória (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006). Além do processo natural de regeneração, células-tronco presentes no tecido hepático adulto (células ovais) são capazes de proliferar, e contribuem para o reparo tecidual em lesões do fígado (TSAMANDAS et al., 2007).

A infecção parasitária também produz modelos eficientes para o estudo da fibrogênese hepática (BOGLIOLO, 1957). Um dos modelos mais utilizados é o da esquistossomose, parasitose que acomete principalmente fígado (hepatomegalia) e baço (esplenomegalia). No modelo murino, a esquistossomose mansônica desenvolve um estágio de lesão hepática num curto espaço de tempo (cerca de dezesseis semanas), apresentando dois quadros histopatológicos distintos, com a formação de granulomas isolados, e o desencadeamento de fibrose periportal, uma

fibrose semelhante à fibrose de Symmers, que ocorre no homem (ANDRADE, 1987; ANDRADE; CHEEVER, 1993).

Diversas substâncias hepatotóxicas têm sido utilizadas no estabelecimento de modelos experimentais de lesão hepática crônica. Uma das mais utilizadas é o Tetracloreto de carbono (CCl_4) (OLIVEIRA et al., 2012). Tipicamente, o CCl_4 é administrado por via intraperitoneal, mas também pode ser aplicado via orogástrica ou através da inalação (CONSTANDINOU; HENDERSON; IREDALE, 2005). O efeito hepatotóxico do CCl_4 já é conhecido há alguns anos. Seu mecanismo de ação compreende a sua metabolização ao radical triclorometil ($-\text{CCl}_3$) pelo citocromo P450, que são expressos em altos níveis nos hepatócitos. Este radical liga-se a macromoléculas, promovendo a peroxidação lipídica pela auto-oxidação dos ácidos graxos e modificando a concentração de cálcio intracelular, induzindo morte celular não somente por necrose, mas também por apoptose (ROBINS; COTRAN, 2000). Inicialmente, a lesão hepática celular causada pelo CCl_4 é intensa e rápida (Figura 2). Ocorre uma diminuição significativa na síntese protéica dos hepatócitos, uma dissociação dos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso e a tumefação do retículo endoplasmático liso. Há um acúmulo de lipídios nas células hepáticas, devido a uma redução na síntese de apoproteínas responsáveis pela exportação de moléculas lipídicas, acarretando a esteatose hepática (IREDALE, 2007).

O CCl_4 também promove lesão nas mitocôndrias e aumenta a permeabilidade da membrana plasmática, promovendo uma tumefação celular, seguidos de influxo em massa de cálcio e consequente morte celular (ROBINS; COTRAN, 2000). O avanço do quadro e a persistência do estímulo resultam em uma condição de lesão hepática crônica, a cirrose experimental, modelo que foi desenvolvido com êxito em camundongos C57BL/6 (OLIVEIRA et al., 2012). O modelo de CCl_4 vem sendo bastante utilizado para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas lesões hepáticas e nos estudos que tentam estabelecer novas medidas terapêuticas (MEDERACK, 2013).

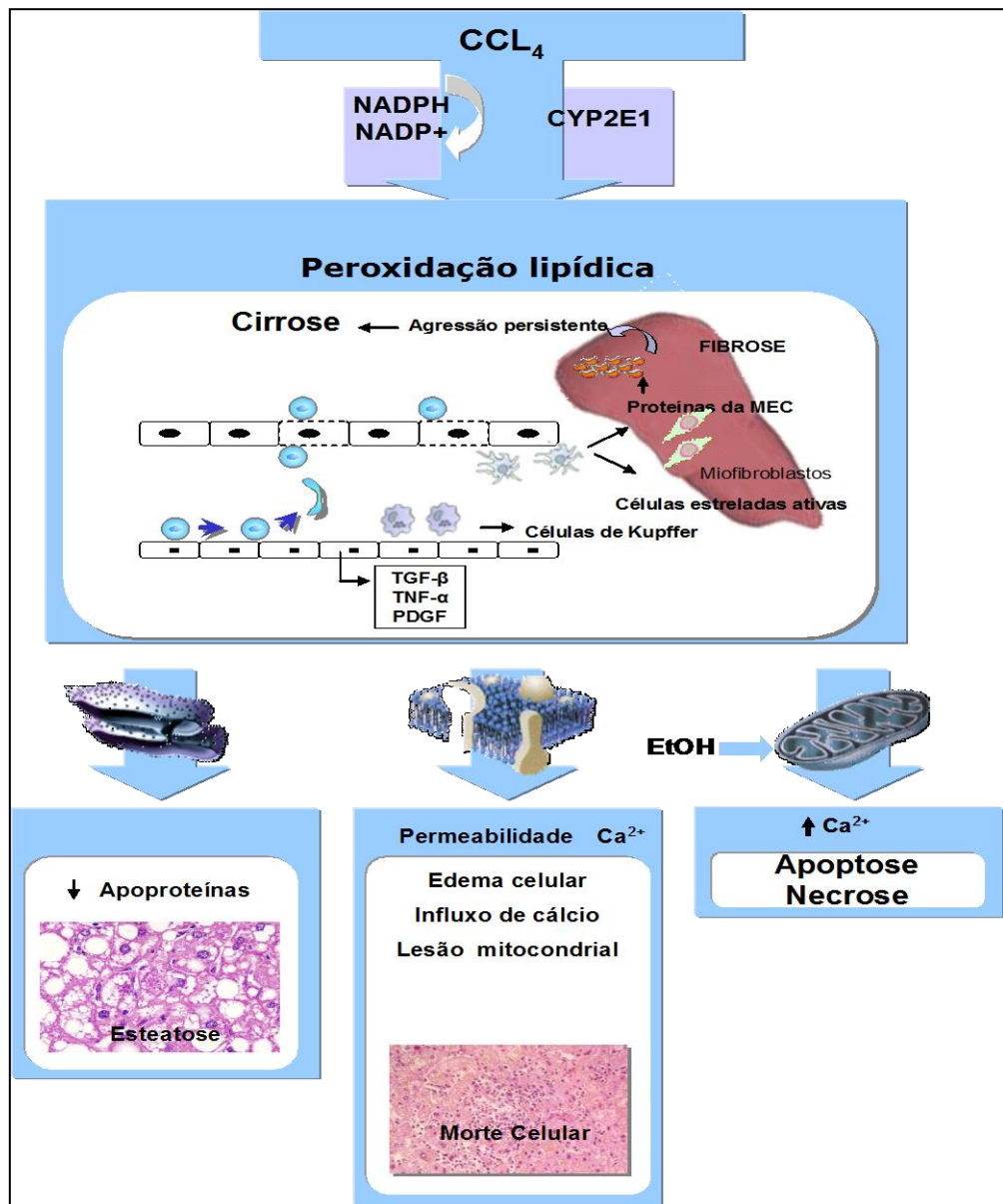


Figura 2. Mecanismo de ação do CCl_4 no tecido hepático.

2.3 Terapias celulares

A terapia celular pode ser definida como um conjunto de métodos e abordagens que busca a utilização de células com potencial terapêutico para o tratamento de várias doenças, inclusive as crônico-degenerativas, com o objetivo de proporcionar melhora e/ou recuperação tecidual (ANVISA, 2012). Populações de células-tronco e células progenitoras indiferenciadas têm chamado atenção pelo seu potencial de auto-renovação, proliferação e diferenciação em outras populações celulares (POTTEN; LOEFFLER, 1990).

Duas populações de células tronco vêm sendo alvo nas pesquisas com terapia celular: As células-tronco embrionárias ou pluripotentes (CTE), que podem dar origem a todos os tipos celulares, com exceção das linhagens que formam os anexos embrionários (VATS et al., 2005), e as células-tronco adultas (CTA) ou multipotentes, com capacidade de diferenciação mais restrita para alguns tipos celulares (TAKAHASHI et al., 2007; PARK et al., 2008).

As CTE estão localizadas na massa interna do blastocisto (THOMSON et al., 1998). Apesar de satisfazer muitos dos requisitos essenciais para fins terapêuticos, estudos experimentais têm relatado que, o transplante de CTE pode acarretar a formação de teratocarcinomas (SOLTER, 2006). Além disso, a manipulação de CTE humanas está associada à questões éticas e religiosas, que dificultam as pesquisas, uma vez que essas células são derivadas de embriões que são destruídos durante o processo para sua obtenção (GILCHRIST; PLEVRIS, 2010).

As CTA estão presentes em muitos tecidos do organismo maduro, sendo componentes de reserva para a manutenção e regeneração do órgão, substituindo células mortas ou danificadas (TAKAHASHI et al., 2007; PARK et al., 2008). Porém, estudos têm demonstrado que as CTA possuem capacidade de migrar para o tecido de interesse e adotar um novo fenótipo funcional, contribuindo para a melhora tecidual. Essa plasticidade observada nas CTA é um dos principais requisitos que reforçam a sua utilização na terapia celular (HERZOG; KRAUSE; KRAUSE, 2003). Outro fator que faz das CTA fortes candidatas à terapia celular é a facilidade com que elas podem ser obtidas, podendo ser adquiridas de várias fontes, tais como medula óssea, fígado, tecido adiposo, músculo estriado cardíaco, trato gastrointestinal e pele (MOORE; LEMISCHKA, 2006; LE BLANC; RINGDEN, 2006).

Dentre as possíveis fontes de obtenção de CTA, a medula óssea pode ser considerada a mais explorada, e uma das mais conhecidas do organismo (BRYDER; ROSSI; WEISSMAN, 2006). Desde a década de 1960, as células presentes na medula são utilizadas no tratamento de pacientes com leucemia, através do transplante de medula óssea, que proporciona um repovoamento completo do sistema hematopoiético (LAGASSE et al., 2000). Há alguns anos, estudos têm apontado que, além de originar e manter os componentes celulares sanguíneos, as células da medula óssea podem ser efetivas no tratamento de doenças que

acometem outros órgãos como o fígado (PETERSEN et al., 1998; LAGASSE et al., 2000).

A medula óssea é constituída por duas populações de células-tronco adultas: a) células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela geração de todas as células do sistema sanguíneo; e b) células-tronco mesenquimais, uma população de células do estroma tecidual que se diferenciam em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e células endoteliais (KUCIA et al., 2005; LE BLANC; RINGDEN, 2006). As células-tronco hematopoiéticas podem dar origem a duas diferentes linhagens celulares, denominadas células precursoras: linhagem linfocítica, que origina os linfócitos T e B, e as células natural Killer (NK); e linhagem mielocítica, que gera os leucócitos (monócitos e granulócitos), hemácias e megacariócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) (Figura 3).

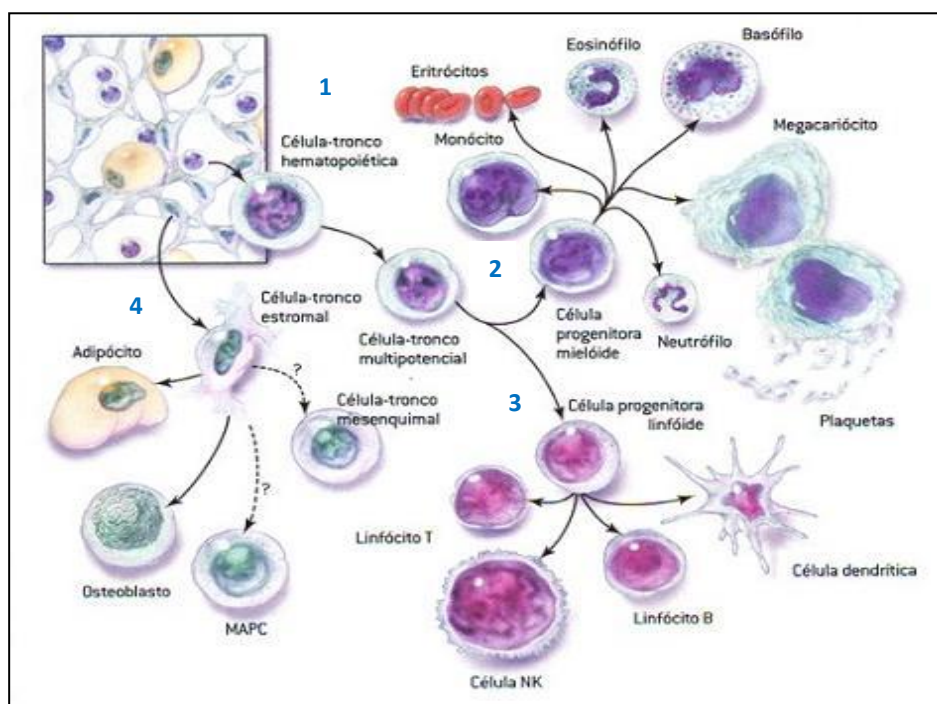


Figura 3: Figura representativa do processo de hematopoiese que ocorre na medula óssea. A célula-tronco hematopoiética (1) origina as duas linhagens celulares do sangue: células progenitoras mielóides (2), e células progenitoras linfóides (3). Já a célula-tronco estromal (4), origina as células mesenquimais, adipócitos e osteoclastos. Fonte: www.medicinageriatrica.com.br.

Nos últimos anos, pesquisas têm aprimorado tecnologia para o desenvolvimento de células-tronco pluripotentes induzidas (IPS), células que podem

ser geradas a partir de tecidos do próprio indivíduo e contribuir para todos os tecidos quando reintroduzidas no organismo (YAKURA et al., 2013). As IPS têm a capacidade de se diferenciar em todas as células somáticas e de manter sua auto-renovação ilimitada. Por isso, têm um grande potencial em pesquisa básica e terapia clínica de muitas doenças. No entanto, os estudos com IPS ainda se encontram em fases iniciais, na busca pela compreensão dos mecanismos de ação e comportamento desta promissora população celular (WANG et al., 2012).

2.4 Terapia celular com células da medula óssea em doenças hepáticas

Num quadro de lesão hepática crônica, um tratamento eficiente deve proporcionar uma redução nos níveis de fibrose, recuperação do parênquima hepático, com consequente melhora da função do fígado. Vários estudos experimentais e clínicos de terapia com células da medula óssea em lesões hepáticas vêm apresentando resultados promissores (TERAI et al., 2006; LYRA et al., 2007). Os dados apontam três possíveis mecanismos de ação envolvidos na terapia com células da medula óssea que podem proporcionar melhora tecidual: 1) Transdiferenciação, onde as células transplantadas dão origem às células específicas do tecido lesado, ou seja, novos hepatócitos; 2) Fusão celular, quando as células transplantadas se fundem às células remanescentes, ativando assim a capacidade proliferativa das células somáticas, e 3) Sinalização parácrina, através da liberação de mediadores químicos (citocinas, enzimas, entre outros) que atuam diretamente (enzimas que degradam a MEC) ou indiretamente (ativação de outras citocinas e células) no processo de reparo do fígado (THORGEIRSSON; GRISHAM, 2006; ALMEIDA-PORADA et al., 2010) (Figura 4). Este último mecanismo vem sendo considerado por grupos de pesquisa como o mais expressivo e importante após o transplante celular, enquanto que os demais processos (transdiferenciação e fusão) acontecem, porém em menor proporção (BRAGA et al., 2008).

Diante das evidências, os mecanismos de atuação das CMMO que podem contribuir para a melhora tecidual ainda não estão completamente esclarecidos. É importante considerar também que os diferentes modelos de lesão, as várias técnicas de tratamento e os métodos avaliativos podem explicar a observação de diferentes fenômenos no processo de reparo tecidual.

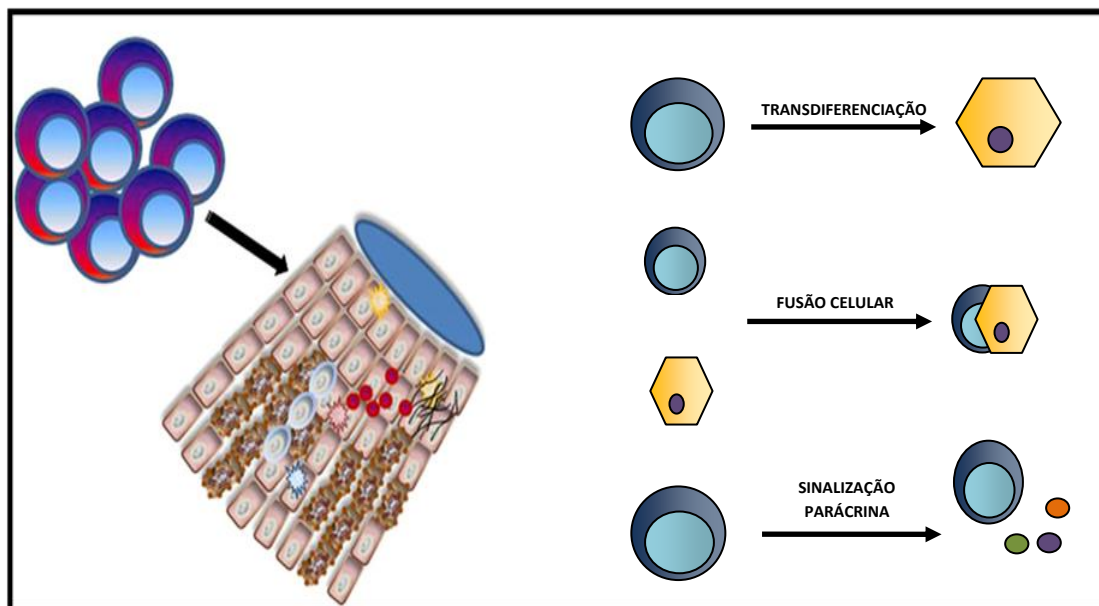


Figura 4: Mecanismos da terapia celular com CMMO no tecido hepático. (A) Transdiferenciação - As células transplantadas se diferenciam em hepatócitos; B) Fusão celular – as células transplantadas se fundem aos hepatócitos remanescentes; C) Sinalização parácrina – as células transplantadas liberam mediadores químicos que irão promover a melhora tecidual. Adaptado de Almeida-Porada et al., (2010).

Os efeitos terapêuticos das CMMO em doenças do fígado vêm sendo demonstrados, tanto em modelos experimentais quanto em ensaios clínicos. Experimentos realizados com ratas, que foram submetidas à aplasia de medula por irradiação, e desenvolveram lesão hepática pela administração do tetracloreto de carbono (CCl_4) e 2-acetilaminofluorano (2-AAF), apresentaram melhora após o tratamento com células da medula óssea de doadores machos, com a detecção de hepatócitos, células ovas e células epiteliais do ducto biliar positivas para o cromossomo Y no tecido hepático de receptoras fêmeas (PETERSEN et al., 1998).

Os efeitos do transplante de células da medula óssea também foram observados em modelo experimental de lesão hepática crônica induzida pela administração de CCl_4 em camundongos. Os animais sofreram aplasia de medula anteriormente à lesão, e em seguida receberam células de medula óssea positivas para a proteína fluorescente verde (EGFP). Os resultados indicaram que um grande número de células EGFP^+ migraram para o fígado cirrótico, e algumas delas expressaram MMP-9 e MMP-13, contribuindo assim para uma diminuição da fibrose e melhora tecidual (HIGASHIYAMA et al., 2006). Também foi observado em modelo

experimental de cirrose hepática induzida pelo CCl₄ que, após a terapia com CMMO, as células transplantadas migraram para a área de lesão e consequente redução significativa nos níveis de fibrose, colágeno tipo I e na expressão de galectina-3 (OLIVEIRA et al., 2012).

Trabalhos de terapia com células de medula óssea em modelo experimental de esquistossomose mansônica de fase crônica demonstrou resultados promissores. Após o transplante, as CMMO foram detectadas próximas a área do granuloma hepático. Os animais submetidos ao tratamento apresentaram ainda uma redução significativa nos percentuais de tecido fibroso, associada à diminuição nos níveis de TGF- β e aumento no número de células ovais e melhora da função hepática (OLIVEIRA et al., 2008).

A terapia com células de medula óssea também pareceu ser benéfica em modelo experimental de lesão hepática aguda. Foi observado que ratos submetidos à lesão hepática aguda induzida pelo CCl₄, e em seguida tratados com CMMO apresentaram maior taxa de sobrevivência 72hs após o transplante, um aumento significativo de mitoses e uma redução nos níveis de Alanina transaminase (ALT) de soro, demonstrando que a terapia com a fração mononuclear promoveu melhora do tecido hepático (BALDO et al., 2010). Em modelo experimental de falência hepática aguda induzida em camundongos pela administração de 2-acetilaminofluorano (2-AAF) e etanol, o transplante com células mononucleares da medula óssea promoveu diminuição da mortalidade induzida pelo 2-AAF (SOUZA et al., 2012).

Baseado nos estudos experimentais, foram desenvolvidos vários estudos de fase clínica (LODI; LANNITI; PALMIERI, 2011). Em ensaios clínicos de fase I, pacientes com cirrose hepática foram submetidos ao transplante autólogo de CMMO. Os resultados indicaram melhora da função hepática após terapia, com aumento nos níveis de albumina de soro, sem efeitos adversos (LYRA et al., 2007). Outros estudos submetem pacientes com cirrose alcoólica ao transplante autólogo de células mononucleares. Doze semanas após a terapia, foi observada uma diminuição significativa nos níveis de bilirrubina de soro, e melhora os níveis de Alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) (PAI et al., 2008).

Mesmo que o tratamento com CMMO tenha promovido resultados positivos, a utilização de populações mistas de células dificulta o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos na melhora tecidual após a terapia (HOULIHAN; NEWSOME,

2008). Vale salientar que a fração mononuclear consiste de uma população heterogênea (células precursoras, monócitos e linfócitos), (ZAGO; COVAS, 2006) e que a identificação das células responsáveis pelo efeito terapêutico é fundamental para o aprimoramento desta modalidade terapêutica.

2.5 Monócitos e terapia celular

Dentre as CMMO, um possível tipo celular responsável pelos efeitos benéficos da terapia são os monócitos. Os monócitos são conhecidos por se diferenciar em vários tipos de fagócitos, incluindo macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, células de Kupffer e micróglia, e desempenham um papel importante na resposta imune (GORDON, 1995; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Podem ser isolados da medula óssea e do sangue periférico. A possibilidade de obtenção deste tipo celular de uma fonte facilmente acessível faz dessa população uma forte candidata a terapia celular nos transplantes autólogos (ZHAO et al., 2003).

Alguns trabalhos apontam duas vias de ativação dos monócitos: a ativação clássica (fenótipo M1), induzida por citocinas de células inflamatórias (resposta Th1), tais como fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) e interferon – gama (INF- γ). Nessa via, as células precursoras se diferenciam em macrófagos, que atuam como células fagocitárias apresentadoras de antígeno e no recrutamento de células de defesa e destruição do agente invasor – resposta inflamatória; a outra via seria de ativação alternativa (fenótipo M2), que pode ser mediada por células T ativadas, mastócitos, basófilos, eosinófilos ou macrófagos, pela liberação de algumas citocinas, como as interleucinas (IL)-4 e IL-13. Essa via de ativação está associada a infecções parasitárias, alergias, inflamação e reparo tecidual (VILLANUEVA; TONTONOV, 2010). Partindo desse conceito, pode-se considerar que a população celular em questão tem atuação nos processos de regeneração de tecidos e órgãos. Sendo assim, pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar o potencial terapêutico dessas células (THOMAS et al., 2011).

Pesquisas indicam que os monócitos podem ser fortes candidatos ao transplante celular, em especial para doenças hepáticas. Inicialmente, estudos *in vitro* foram realizados para verificar o comportamento dos monócitos em cultura condicionada. O cultivo de monócitos de medula óssea ou sangue periférico

associado a fatores de crescimento pode resultar na formação de hepatócitos funcionalmente ativos. Trabalhos descrevem que monócitos obtidos de sangue periférico humano se diferenciaram em células hepáticas pelo uso de fatores de crescimento hepático (ZHAO et al., 2003; EHNERT et al., 2011). Os novos hepatócitos obtidos por cultura de monócitos apresentaram capacidade funcional, bioquímica e metabólica, demonstrada qualitativamente e quantitativamente, quando comparados aos hepatócitos originais (RUHNKE et al., 2005). Estudos realizados com monócitos obtidos de sangue periférico de pacientes infectados pelo vírus da hepatite B com cirrose descompensada observaram a capacidade de diferenciação dessas células em hepatócitos funcionalmente ativos, demonstrando mais uma vez o potencial terapêutico dessa população celular. Diante dos achados, é de grande relevância a investigação do comportamento dos monócitos *in vivo*, verificando seu potencial terapêutico frente às lesões hepáticas crônicas (YAN et al., 2007).

A separação e purificação de populações celulares vêm sendo uma prática bastante frequente. Recentemente, abordagens científicas descrevem métodos que possibilitam a obtenção de células purificadas fazendo o uso de marcadores, onde anticorpos específicos para receptores celulares se ligam às células e permitem sua caracterização, fenotipagem e até mesmo isolamento (FONG; GAUTHAMAN; BONGSO, 2010). Monócitos podem ser obtidos seguindo alguns protocolos de purificação celular, com base na sua especificidade de marcadores. A literatura aponta os fenótipos CD11b e CD14 como os antígenos que melhor caracterizam a linhagem monocítica (AULT; SPRINGER, 1981; GRACE et al., 2002). O antígeno CD11b, em humanos, é fortemente expresso em células mielóides, e pouco expresso em células NK e em alguns linfócitos ativados (BELLER; SPRINGER; SCHREIBER, 1982). Em camundongos, o antígeno CD11b é expresso em monócitos/macrófagos, e em menor proporção em granulócitos, células NK, células B e uma subpopulação de células dendríticas (LAGASSE, WEISSMAN, 1996). Já o fenótipo CD14 é um marcador específico para monócitos/macrófagos de camundongos e humanos (FEARNS et al., 1995).

É possível obter uma população purificada de células CD11b⁺/CD14⁺ a partir da camada mononuclear da medula óssea (CMMO). As células CD11b⁺/CD14⁺ obtidas pelo método de separação magnética (MACs) podem ser utilizadas para fins de pesquisa, para análise, caracterização e cultivo celular, bem como para o

transplante de células. Levando em consideração a especificidade dos anticorpos CD11b e CD14, é possível afirmar que, células purificadas da camada mononuclear da medula óssea que são positivas para os referidos fenótipos em mais de 90% de sua totalidade, são consideradas monócitos. Dessa forma a presente pesquisa visa avaliar o potencial terapêutico de células CD11b⁺ obtidas da camada mononuclear da medula óssea (CMMO) em modelo murino de cirrose hepática.

3 REFERÊNCIAS

ALISON, M.; ISLAM, S.; LIM, S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. **J. Pathol.**, v. 217, p. 282-298, 2009.

ALMEIDA-PORADA, G.; ZANJANI, E.D.; PORADA, C.D. Bone marrow stem cells and liver regeneration. **Exp. Hematol.**, v. 38, n. 7, p. 374-380, 2010.

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

ANTHONY, P.P.; ISHAK, K.G.; NAYAK, N.C.; POULSEN, H.E.; SCHEUER, P.J.; SOBIN, L.H. The morphology of cirrhosis. Working group sponsored by the World Health Organization. **J. Clin. Pathol.**, v. 31, p. 395-414, 1978.

ANVISA 2012 [homepage da internet]. www.anvisa.gov.br

ARENAS, I.A.; XU, Y.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; DAVIDGE, S.T. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- α . **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 286, p.779–784, 2004.

ARTEAGA, C.L.; DUGGER, T.C.; HURD, S.D. The multifunctional role of transforming growth factor (TGF)- β on mammary epithelial cell biology. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 38, p.49–56, 1996.

ARTHUR, M.J. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. **Gastroenterology**, v.122, p.1525–1528, 2002.

AULT, K.A.; SPRINGER, T.A. Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal antibody (anti-Mac-1) with human monocytes and natural killer cells. **J Immunol.**, v.126, n. 1, p. 359-364, 1981.

BAEK, J.Y.; MORRIS, S.M.; CAMPBELL, J.; FAUSTO, N.; YEH, M.M.; GRADY, W.M. TGF- β inactivation and TGF- α overexpression cooperate in an in vivo mouse model to induce hepatocellular carcinoma that recapitulates molecular features of human liver cancer. **Int. J. Cancer**, v. 127, p.1060–1071, 2010.

BALDO, G.; GIUGLIANI, R.; URIBE, C.; BELARDINELLI, M.C.; DUARTE, M.E.S.; MEURER, L.; SILVEIRA, T.R.; MATTE, U. Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl₄ acute liver damage. **Dig. Dis. Sci.**, v. 55, p. 3384–3392, 2010.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver fibrosis. **J. Clin Invest.**, v. 115, p.209-218, 2005.

BELARDINELLI, M.C.; PEREIRA, F.S.; BALDO, G.; VICENTE TAVARES, A.M.; KIELING, C.O.; DA SILVEIRA, T.R.; MEURER, L.; SOARES DUARTE, M.E.; GIUGLIANI, R.; MATTE, U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen- induced hepatic failure. **Toxicology**, v. 247, p. 1-5, 2008.

BELLER, D.I.; SPRINGER, T.A.; SCHREIBER, R.D. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. **J. Exp. Med.**, v.156, n. 4, p.1000-1009, 1982.

BHUNCHET, E.; WAKE, K. Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. **Hepatology**, v.16, p.1452–1473, 1992.

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

BOOTH, J.C.; O'GRADY, J.; NEUBERGER, J. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. **Gut**, v.49, n.1, p.1–21, 2001.

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.

BRAGA, L.M.; ROSA, K.; RODRIGUES, B.; MALFITANO, C.; CAMASSOLA, M.; CHAGASTELLES, P.; LACCHINI, S.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; SCHAAAN, B.D.; IRIGOYEN, M.C.; NARDI, N.B. Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.35, p.113-119, 2008.

BRYDER D.; ROSSI D.J.; WEISSMAN I.L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-especific stem cell. **Am. J. Pathol.**, v.169, p.338-346, 2006.

CONSTANDINOU, C.; HENDERSON, N.; IREDALE, J.P. Modeling liver fibrosis in rodents. **Methods Mol Med.**, v. 117, p. 237-250, 2005.

CUTBERT, J.A. Hepatitis A: Old and new. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, p.38-58, 2001.

CZAJA, A.J.; CARPENTER, H.A. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. **J. Hepatol.**, v.40, p.646–652, 2004.

EHNERT, S.; SEELIGER, C.; VESTER, H.; SCHMITT, A.; SAIDY-RAD, S.; LIN, J.; NEUMAIER, M.; GILLEN, S.; KLEEFF, J.; FRIESS, H.; BURKHART, J.; STÖCKLE, U.; NÜSSLER, A.K. Autologous serum improves yield and metabolic capacity of monocyte-derived hepatocyte-like cells: possible implication for cell transplantation. **Cell Transp.**, v.20, n.9, p.1465-1477, 2011.

ENG, F.J.; FRIEDMAN, S.L. Fibrogenesis: I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. **Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.**, v.279, p.7-11, 2000.

FALLON, M.B.; ABRAMS, G.A. Pulmonary dysfunction in chronic liver disease. **Hepatology**, v.32, p.859-865, 2000.

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.; RIEHLE, K.J. Liver Regeneration. **Hepatology**, v.43, p.45-53, 2006.

FEARNS, C.; KRAVCHENKO, V.V.; ULEVITCH, R.J.; LOSKUTOFF, D.J. Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v.181, n.3, p.857-866, 1995.

FERNÁNDEZ, M.; SEMELA, D.; BRUIX, J.; COLLE, I.; PINZANI, M.; BOSCH, J. Angiogenesis in Liver Disease. **J. Hepatol.**, v.50, p. 604–620, 2009.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v.9, p.669–676, 2003.

FORBES, S.J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.25, n.2, p.207-217, 2011.

FONG, C.; GAUTHAMAN, K.; BONGSO, A. Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. **J. Cel. Biochem.**, v.111, p.769–781, 2010.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Gastroenterology**, v.134, p.1655-1669, 2008.

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.; SHEPPARD, D.; DUFFIELD, J.S.; VIOLETTE, S. Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. **Sci. Transl. Med.**, v.5, p.1-17, 2013.

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

GILCHRIST, E.S.; PLEVRIS, J.N. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. **Liver transpl.**, v. 16, p.118-129, 2010.

GINES, P., CARDENAS, A., ARROYO, V., RODES, J. Management of cirrhosis and ascites. **N. Engl. J. Med.**, v.350, p.1646-1654, 2004.

GONG, W.; ROTH, S.; MICHEL, K.; GRESSNER, A.M. Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells. **Gastroenterology**, v.11, p.352–363, 1998.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**, v.17, p.966-977, 1995.

GRACE, L.S.U.; GOYERT, S.M.; FAN, M.; AMINLARI, A.; GONG, K.Q.; KLEIN, R.D.; MYC, A.; ALARCON, W.H.; STEINSTRASSER, L.; REMICK, D.G.; WANG, S.C. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.283, p.640-645, 2002.

GRESSNER, A.M.; WEISKIRCHEN, R.; BREITKOPF, K.; DOOLEY, S. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. **Front Biosci.**, v.7, p.793–807, 2002.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KISTENS, L. Human Schistosomiasis. **The lancet**, v.368, p.1106-1118, 2006.

GUYOT, C.; LEPREUX, S.; COMBE, C.; DOUDNIKOFF, E.; BIOULAC-SAGE, P.; BALABAUD, C.; DESMOULIÈRE, A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. **The Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.38, p.135-151, 2005.

HERBST, H.; FREY, A.; HEINRICHS, O.; MILANI, S.; BECHSTEIN, W.O.; NEUHAUS, P.; SCHUPPAN, D. Heterogeneity of liver cells expressing procollagen type I and IV in vivo. **Histochem. Cell Biol.**, v.107, p.399– 409, 1997.

HERZOG, E.L.; KRAUSE, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, n.10, p.3483-3493, 2003.

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.

HOULIHAN, D.D.; NEWSOME, P.N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. **Gastroenterology**, v.135, p.438-450, 2008.

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.

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

JIN, Y.L.; ENZAN, H.; KURODA, N.; HAYASHI, Y.; TOI, M.; MIYAZAKI, E.; HAMAUZU, T.; HIROI, M.; GUO, L.M.; SHEN, Z.S.; SAIBARA, T. Vascularization in

tissue remodeling after rat hepatic necrosis induced by dimethylnitrosamine. **Med. Mol. Morphol.**, v.39, p.33-43, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro, RJ; Editora Guanabara Koogan, 2008. 488p.

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

KINNMAN, N.; HOUSSET, C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. **Front Biosci.**, v.7, p.496-503, 2002.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D.A. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. **B. Pract. R. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, p.305-317, 2011.

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

KUCIA, M.; RECA, R.; JALA, V.R.; DAWN, B.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M.Z. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. **Leukemia**, v.19, p.1118-1127, 2005.

KUMAR, A.; OATI, N.T.; SARIN, S.K. Use of stem cells for liver disease – Current scenario. **J. Clin. Exp. Hepatol.**, v.1, p.17-26, 2011.

KWEON YO, GOODMAN ZD, DIENSTAG JL, SCHIFF ER, BROWN NA, BURCHARDT E, et al. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis **B. J. Hepatol.**, v.35, p.749–755, 2001.

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, n.11, p.1229-1234, 2000.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I.L. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J. Immunol. Methods**, v.197, n.1-2, p.139-150, 1996.

LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S.; REISCH, J.S.; SCHIÄ, D.T.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.1364-1372, 2005.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. **Curr. Opin. Immunol.**, v.18, p.586-591, 2006.

LODI, D.; LANNITI, T.; PALMIERI, B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.30, p.9, 2011.

LOK, A.S.F.; McMAHON, B.J. Chronic Hepatitis B. **Hepatology**, v.45, n.2, p.507-539, 2007.

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. **W. J. Gastroenterol.**, v.13, p.1067-1073, 2007.

MAHER, J.J.; McGUIRE, R.F. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. **J. Clin. Invest.**, v.86, p.1641-1648, 1990.

MARRA, F.; CHOUDHURY, G.G.; PINZANI, M.; ABBOUD, H.E. Regulation of platelet-derived growth factor secretion and gene expression in human liver fat-storing cells. **Gastroenterology**, v.107, p.1110-1117, 1994.

MEDERACK, I. Liver Fibrosis – Mouse Models and Relevance in Human Liver Diseases. **Z. Gastroenterol.**, v. 51, p.55-62, 2013.

MOORE, K.A.; LEMISCHKA, I.R. Stem cells and their niches. **Science**, v.311, p.1880-1885, 2006.

OLIVEIRA, S.A.; DE FREITAS SOUZA, B.S.; SÁ BARRETO, E.P.; KANETO, C.M.; NETO, H.A.; AZEVEDO, C.M.; GUIMARÃES, E.T.; DE FREITAS, L.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B. Reduction of galectin 3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, v.14, p.339-349, 2012.

OLIVEIRA, S.A.; SOUZA, B.S.; GUIMARAES-FERREIRA, C.A.; BARRETO, E.S.; SOUZA, S.C.; FREITAS, L.A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. **World J Gastroenterol**, v.14, n.38, p.5842-5850, 2008.

PAI, M.; ZACHAROULIS, D.; MILICEVIC, M.N.; HELMY, S.; JIAO, L.R.; LEVIAR, N.; TAIT, P.; SCOTT, M.; MARLEY, S.B.; JESTICE, K.; GLIBETIC, M.; BANSI, D.; KHAN, S.A.; KYRIAKOU, D.; ROUNTAS, C.; THILLAINAYGAM, A.; NICHOLLS, J.; JENSEN, S.; APPERLEY, J.F.; GORDON, M.Y.; HABIB, N.A. autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34⁺ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. **The Am. J. Gastroenterol.**, v.103, p. 952-1958, 2008.

PARK, I.H.; ZHAO, R.; WEST, J.A.; YABUUCHI, A.; HUO, H.; INCE, T.A. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**, v.451, p.141-146, 2008.

PETERSEN, B.E.; ZAJAC, V.F.; MICHALOPOULOUS, G.K. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. **Hepatology**, v.27, p.1030-1038, 1998,

PINZANI, M.; ROSSELLI, M.; FELLOW, R.; ZUCKERMANN, M.; SURGEON, C. Liver cirrhosis, **B. Pract. R. Clin. Gastroenterol.**, v.25. p.281–290, 2011.

POPPER, H.; KENT, G. Fibrosis in chronic liver diseases. **Clin. Gastroenterol.**, v.4, p.315-332, 1975.

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.

RAMADORI, G.; SAILE, B. Portal tract fibrogenesis in the liver. **Lab. Invest.**, v.84, p.153–159, 2004.

ROBINS; COTRAN. **Patologia Estrutural e funcional**. 6ª ed., Guanabara Koogan, 2000.

RUHNKE, M.; NUSSLER, A.K.; UNGEFROREN, H.; HENGSTLER, J.G.; KREMER, B.; HOECKH, W.; GOTTWALD, T.; HEECKT, P.; FANDRICH, F. Human monocyte-derived neohepatocytes: A promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. **Transplantation**, v.79, n.9, p.1097-1103, 2005.

SCHUPPAN, D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. **Semin. Liver Dis.**, v.10, n.1, p.1-10, 1990.

SHUPPAN, D.; RUEHL, M.; SOMASUNDARAM, R.; HAHN, E.G. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Semin. Liver Dis.**, v.21, p.351-372, 2001.

SCHUPPAN, D.; AFDHAL, N.H. Liver Cirrhosis. **Nat. Inst. Health**, v.371, p.838–851, 2009.

SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cells research. **Nat. Rev. Genet.**, v.7, p.319-327, 2006.

SOUZA, B.S.F.; NASCIMENTO, R.C.; OLIVEIRA, S.A.; VASCONCELOS, J.F.; KANETO, C.M.; CARVALHO, L.F.P.P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B.P.; FREITAS, L.A.R. Transplantation of bone marrow cells decreases tumor necrosis factor- production and blood – brain barrier permeability and improves survival in a mouse model of acetaminophen-induced acute liver disease. **Citotherapy**, v.1, p.1-11, 2012.

STARZI, T.E., THIEL, D.V., TZAKIS, A.G., WATSUKI, S., TODO, S., MARSH, J.W., KONERU, B., STASCHAK, S., STIEBER, A., GORDON, R.D. Orthotopic liver transplantation for alcoholic cirrhosis. **The J. Amer. Med. Assoc.**, v.260, p.2542-2544, 1988.

SUBEQ, Y.M.; KE, C.Y.; LIN, N.T.; LEE, C.J.; CHIU, Y.H.; HSU, B.G. Valsartan decreases TGF-beta1 production and protects against chlorhexidine digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. **Cytokine**, v.53, p.223–230, 2011.

TAKAHASHI, K.; TNBE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, p.861-872, 2007.

TAMAYO, R.P. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? **Hepatology**, v.3, p.112-120, 1983.

TAYLOR, R.M.; DAVEN, 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.

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

THOMAS, J.A.; POPE, C.; WOJTACHA, D.; ROBSON, A.J.; GORDON-WALKER, T.T.; HARTLAND, S.; RAMACHANDRAN, P.; VAN DEEMTER, M.; HUME, D.A.; IREDALE, J.P.; FORBES, S.J. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration and function. **Hepatology**, v. 53, n.6, p. 2003-2015, 2011.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWELERGLEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, p.1145-1147, 1998.

THORGEIRSSON, S.S.; GRISHAM, J.W. Haematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. **Hepatology**, v.43, p.2-8, 2006.

TSAMANDAS, A.C.; ANTONACOPOULOU, A.; KALOGEROPOULOU, C.; TSOTA, I.; ZABAKIS, P.; GIANNOPOULOU, E.; LIAVA, A.; TZELEPI, V.; TEPETES, K.; PETSAS, T.; KARDAMAKIS, D.; KALOFONOS, H.P. Oval cell proliferation in cirrhosis in rats. An experimental study. **Hepatol. Res.**, v.37, p.755-764, 2007.

TSUKADA, S.; PARSONS, C.J.; RIPPE, R.A. mechanisms of Liver Fibrosis. **Clin Chim Acta**, v.364, p.33-60, 2006.

VATS, A.; BIELBY, R.C.; TOLLEY, N.S.; NEREM, R.; POLAK, J.M. Stem cells. **Lancet**, v.366, p.592-602, 2005.

VILLANUEVA, C.J.; TONTONNOZ, P. licensing PPAR γ to work in macrophages. **Immunity**, v.33, p.647-649, 2010.

WANG, X.; WILLENBRING, H.; AKKARI, Y.; TORIMARU, Y.; FOSTER, M.; AL-DHALIMY, M.; LAGASSE, E.; FINEGOLD, M.; OLSON, S.; GROMPE, M. Cell fusion the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature**, v.422, p.897-901, 2003.

WANG, X.; CHEN, X.; ZHANG, H.; QIN, W.; XUE, Y.; ZENG, F. Shared Gene regulation during Human Somatic Cell Reprogramming. **J Genet Genomics**, v.20, p.613-623, 2012.

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.

YAKURA, Y.; ISHIHARA, C.; KUROSAKI, H.; KAZUKI, Y.; KOMATSU, N.; OKADA, Y.; DOI, T.; TAKEYA, H.; OSHIMURA, M. An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.3, p.132-145, 2013.

YAN, L.; HAN, Y.; WANG, J.; LIU, J.; HE, Y.; WANG, H.; FAN, D. Peripheral blood monocytes from the descompensated liver cirrhosis could migrate into nude mouse liver with human hepatocyte-markers expression. **Bioch. And Biophys. Res. Comm.**, v.371, p.635-638, 2008.

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.**, v.82, p.949-54, 2007.

YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; YOSHII, J.; IKENAKA, Y.; NOGUCHI, R.; HICKLIN, D.J.; WU, Y.; YANASE, K.; NAMISAKI, T.; YAMASAKI, M.; TSUJINOUE, H.; IMAZU, H.; MASAKI, T.; FUKUI, H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. **Gut**, v.52, p.1347–1354, 2003.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo, SP; Editora Atheneu, 2006. 245p.

ZHAN, Y.; WANG, I.; WEI, H.; CHEN, X.; FEI, C.R.; GAO, Y.; LIU, F. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. **Transp. Proc.**, v.38, p.3082-3085, 2006.

ZHAO, Y.; GLESNE, D.; HUBERMAN, E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. **PNAS**, v.100, n.5, p.2426-2431, 2003.

CAPÍTULO II

Efeitos terapêuticos de células CD11b⁺ isoladas de medula óssea em modelo experimental de cirrose hepática

Veruska C.A. Souza^{1,2};

Valéria Wanderley-Teixeira¹;

Andréia F. Barros²;

Camila L. Carvalho²;

Virgínia M. B. Lorena²;

Vláudia M. A. Costa³;

Álvaro A. C. Teixeira¹;

Sheilla A. Oliveira².

1 Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE- Brasil.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ – PE – Brasil.

3 Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco – UFRPE - Brasil.

Resumo

. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial terapêutico de células CD11b⁺ de medula óssea em modelo experimental de cirrose. Camundongos C57BL/6 isogênicos receberam, durante seis meses, por via orogástrica, 200µL de uma solução de CCl₄ 20% diluído em azeite de oliva e etanol 5%. Após o estabelecimento da lesão, os animais foram submetidos à terapia com células CD11b⁺ de medula óssea, células mononucleares totais de medula óssea (CMMO), CMMO sem CD11b⁺ e salina. As células CD11b⁺ foram obtidas da camada mononuclear da medula óssea de camundongos C57BL/6, por separação imunomagnética. Dois meses após a terapia, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do fígado, para avaliações morfológicas, morfométricas, imunoistoquímicas e dosagem de hidroxiprolina. A caracterização celular por citometria de fluxo revelou que a fração obtida por esse método é constituída de população homogênea de monócitos. Dois meses após o transplante, as análises morfológicas, morfométricas e bioquímicas exibiram diminuição no percentual de fibrose, nos níveis de hidroxiprolina e aumento significativo no número de células de Kupffer no tecido hepático. Ensaios imunohistoquímicos mostraram processos de proliferação celular e apoptose mais evidentes nos grupos que não receberam células CD11b⁺. Pôde-se concluir que, o método de obtenção das células CD11b⁺ é considerado viável e que o transplante destas células para fígados cirróticos é capaz de reduzir os níveis de fibrose, sugerindo possível aplicação terapêutica desta população celular no tratamento das hepatopatias crônicas.

Palavras-chave: fígado; terapia celular; imunohistoquímica; cirrose; células CD11b⁺

Abstract

This study aimed to evaluate the therapeutic potential of CD11b⁺ cells from bone marrow in experimental cirrhosis pattern. C57BL/6 inbred mice received during six months 200µL of 20% CCl₄ solution in ethanol 5%, by an orogastric pathway. After the lesion establishment, the animals underwent therapy with CD11b⁺ cells from bone marrow, bone marrow mononuclear cells (BMMC), BMMC without CD11b⁺ and saline. CD11b⁺ cells were obtained from bone marrow mononuclear layer of C57BL/6 mice by immunomagnetic separation. The cell characterization by flow cytometry revealed fraction obtained by this method consisting of homogeneous population of monocytes. Two months after transplantation, the morphological, biochemical and morphometric exhibited decrease in the percentage of fibrosis, hydroxyproline levels and a significant increase in the number of Kupffer cells in the liver tissue. Immunohistochemical assays showed both proliferation and apoptosis were most evident in groups that received no cells CD11b⁺. It was concluded that the method of obtaining of the cells CD11b⁺ is considered feasible and transplantation of these cells in cirrhotic livers are capable of reducing levels of fibrosis, suggesting possible therapeutic application of this cell population in the treatment of chronic liver disease.

Keywords: liver; cell therapy; immunohistochemistry; cirrhosis; CD11b⁺ cells.

Introdução

A cirrose é a consequência da evolução da maioria das doenças crônicas do fígado, processo difuso caracterizado pela formação de tecido fibroso, nódulos cirróticos e hipertensão portal, com consequentes alterações na arquitetura do órgão (1,2). Tais condições patológicas resultam em perda progressiva da função do fígado, que culmina na Insuficiência hepática (3).

A fibrose hepática é considerada uma das condições mais relevantes da cirrose, sendo o resultado de uma reação crônica de cicatrização que ocorre em resposta à lesões persistentes ao parênquima hepático (infecções virais e parasitárias, agressões tóxicas, metabólicas e auto-imunes) (4-8). Consiste na deposição excessiva de componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente fibras colágenas dos tipos I e III, ocasionada pelo desequilíbrio entre produção e degradação de MEC (9). Sendo assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas anti-fibrogênicas para as doenças crônicas do fígado é necessário.

Atualmente, o sistema público de saúde considera o transplante de fígado como a única terapia efetiva para pacientes hepatopatas diagnosticados com cirrose descompensada (10). Porém, a falta de órgãos, os elevados custos, os altos riscos durante o procedimento, e a grande demanda de pacientes que necessitam de um novo órgão dificultam ainda mais a realização desta modalidade terapêutica (11,12). Diante desse cenário, há uma busca por novas opções de tratamentos mais baratos, menos invasivos e que apresentem poucas complicações.

Dentre as possíveis alternativas terapêuticas, o transplante celular tem se mostrado bastante promissor para as doenças do fígado (13). Estudos experimentais relatam uma melhora nos parâmetros morfológicos, bioquímicos e funcionais em modelos animais de lesão hepática crônica, após tratamento com

células mononucleares de medula óssea (14, 15). Alguns trabalhos de fase clínica I (doença hepática crônica avançada, com ausência de tumores hepáticos), também descrevem o comportamento dos pacientes cirróticos submetidos à terapia com células mononucleares de medula óssea (11,16). Porém, algumas questões permanecem desconhecidas. É de grande interesse esclarecer quais os mecanismos envolvidos no processo de regeneração tecidual promovida pela terapia celular, bem como identificar qual população de células seria a mais adequada para proporcionar melhoras significativas no fígado.

Estudos recentes revelam que monócitos CD11b⁺ podem apresentar um potencial terapêutico relevante nas hepatopatias crônicas. Ensaio *in vitro* demonstraram que, monócitos mantidos em cultura, condicionado com fatores de crescimento de hepatócitos, apresentaram um comportamento muito semelhante às células hepáticas obtidas de cultura de fígado (17). Outros achados revelaram que monócitos em cultura expressaram enzimas e citocinas envolvidas no processo de regeneração hepática, reforçando ainda mais sua possível utilização no transplante celular (18). Sendo assim, o nosso trabalho teve como objetivos padronizar a técnica de separação das células CD11b⁺ de medula óssea e avaliar o seu potencial terapêutico em modelo murino de cirrose hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄).

Materiais e métodos

Animais.

Foram utilizados 130 camundongos adultos C57BL/6 isogênicos, com peso variável entre 20-23g, de ambos os sexos, obtidos do Centro de Criação de Animais

de Laboratório (CECAL). Os animais foram mantidos no Biotério Experimental do CPqAM/FIOCRUZ-Recife em condições ideais de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclos de 12h claro/escuro), recebendo alimentação *ad libitum* da dieta padrão comercial para camundongos (Nuvilab, Curitiba, PR). Todos os procedimentos foram realizados obedecendo rigorosamente às recomendações do Guia de Uso de Animais de Laboratório em pesquisa científica, e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. O respectivo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (FIOCRUZ/CPqAM), protocolado sob o nº 15/2011.

Grupos experimentais.

Os animais foram distribuídos randomicamente em cinco grupos: Grupo I. Camundongos C57BL/6 isogênicos submetidos à cirrose hepática e tratados com células mononucleares de medula óssea CD11b⁺ (n=5); Grupo II. Camundongos C57BL/6 isogênicos submetidos à cirrose hepática e tratados com células mononucleares totais de medula óssea (CMMO totais) (n=5); Grupo III. Camundongos C57BL/6 isogênicos submetidos à cirrose hepática e tratados com células mononucleares de medula óssea sem CD11b⁺ (n=5); Grupo IV. Camundongos C57BL/6 isogênicos submetidos à cirrose hepática e tratados com salina estéril (veículo) (n=5); Grupo V. Camundongos C57BL/6 isogênicos sem lesão (grupo controle) (n=5).

Indução de cirrose por intoxicação pelo tetracloreto de carbono (CCl₄).

A cirrose hepática foi induzida nos camundongos pela administração, duas vezes por semana, por via orogástrica, de CCl₄ a 20%, diluído em azeite de oliva.

Os animais receberam ainda etanol (EtOH 5%) diluído na água de beber *ad libitum*. Esse estímulo foi mantido por um período de seis meses contínuos (18).

Obtenção de CMMO totais e isolamento de células CD11b⁺ de medula óssea.

Camundongos C57BL/6 isogênicos foram submetidos à eutanásia por overdose dos anestésicos Ketamina (115mg/kg do peso do animal) e Xilasina (80mg/kg do peso do animal). As células de medula óssea foram obtidas a partir dos fêmures e tíbias dissecados, eliminando os tecidos muscular e conjuntivo associados. Foram feitos dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular, onde foi injetado meio RPMI 1640 (Sigma, pH 7,2) com antibiótico a 1% (penicilina-estreptomicina) sem soro. A fração enriquecida em CMMO localizada na interface da suspensão celular foi obtida por centrifugação em gradiente de ficoll (Ficoll-histopaque 1077 e 1119 – Sigma). Para o isolamento das células CD11b⁺, foi utilizado um volume de 500 µL das CMMO totais (3×10^7 células/mL) cobertas com os anticorpos CD11b⁺ conjugados a microesferas magnéticas (Unidades de MACS™). Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em uma coluna de separação magnética (MACS™), onde ficaram retidas as células CD11b⁺. Essas células foram recuperadas em PBS/BSA 0,5% + EDTA 2mM e posteriormente uma alíquota da suspensão celular (10µL) foi corada em Azul de Trypan e as células foram contadas em microscópio óptico, com auxílio de câmara de Neubauer. Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de salina estéril para então ser infundidas nos animais.

Caracterização da população de células CD11b⁺ por citometria de fluxo.

As células CD11b⁺ obtidas por separação imunomagnética foram ressuspendidas em PBS/BSA 0,5% + EDTA 2mM e, após contagem, 10⁶ de células foram colocadas em tubos para citometria e incubadas com 10 µL dos seguintes anticorpos para fenotipagem: Anti-CD11b (PE Rat Anti-Mouse CD11b, BD Pharmingen™), Anti-CD14 (FITC Rat Anti-Mouse CD14, BD Pharmingen™), Anti-CD34 (PE Rat anti-Mouse CD34, BD Pharmingen™), Anti-CD45 (APC Rat Anti-Mouse CD45, BD Pharmingen™), Anti-Ly6A (PE-Cy™7 Rat Anti-Mouse Ly-6A/E, BD Pharmingen™). Após 20 minutos de incubação, as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS e azida sódica 0,05%, e posteriormente contadas e classificadas em citômetro FACScalibur (Becton Dickinson).

Infusão das células nos animais cirróticos.

Doses de 10⁷ células, para cada animal (~200 µL da suspensão celular em salina) foram infundidas uma vez por semana, através da veia caudal, durante três semanas consecutivas em todos nos animais que receberam células CD11b⁺, CMMO totias e CMMO sem CD11b⁺. Um grupo de animais com lesão hepática crônica recebeu doses de salina estéril, em condições similares. Dois meses após o início da terapia, os animais foram submetidos à eutanásia, para a coleta do fígado.

Avaliação morfológica e morfométrica.

Fragmentos de fígado foram fixados em formol 10% por 48 horas. Após inclusão em parafina, secções histológicas com 5µm de espessura foram coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação das lesões hepáticas, e pelo sírius-red e fast green para estudo do colágeno (19). Para a quantificação do tecido fibroso hepático, dez áreas do corte histológico foram utilizadas para a realização da

morfometria semi-automática, usando o programa LEICA QWin Plus versão 2.6 (LEICA). Também foram realizados estudos morfométricos do fígado através de métodos estereológicos (20). Foi determinada a proporção entre o parênquima não lobular e lobular do fígado, utilizando ocular microscópica contendo quadrícula composta de 100 pontos-teste, posicionada sobre os cortes das preparações histológicas coradas pela H&E. Em cinco lâminas por grupo, foi efetuada a contagem em 10 campos por lâmina, com a objetiva de 40x. De maneira semelhante, foram quantificadas as células de Kupffer. Além disso, pelos estudos morfológicos do tecido hepático foram avaliadas alterações estruturais, presença de balonização celular, grau e tipo de esteatose encontrada, áreas de necrose e proliferação ductular.

Dosagem de Hidroxiprolina.

Amostra de fígado, obtida do lobo maior, pesando entre 100 e 200 mg, foi usada para determinação de hidroxiprolina constituinte do colágeno (21). As amostras foram processadas e analisadas segundo a metodologia de Bergman & Loxley (1973), analisadas em espectrofotômetro automático (Pharmacia, modelo Ultrospec 3000), em densidade óptica de 558 nm, para a obtenção dos valores da concentração molar de cada amostra (nMol).

Imunoistoquímica para proliferação celular.

Cortes de 5 µm de fragmentos de fígado incluídos em parafina e dispostos em lâminas tratadas em poli-lisina foram utilizados para a detecção de células em proliferação. Inicialmente, os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em banhos crescentes de etanol. Em seguida, as amostras foram tratadas com H₂O₂ 3%

por uma hora para inibição da peroxidase endógena. Os cortes foram incubados com o anticorpo Monoclonal mouse antígeno nuclear de proliferação celular (NCL-L-PCNA – Leica Microsystems), diluição 1:100, por uma hora. Aproximadamente 100µL do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (N-Histofine simple stain max PO, Nichirei Biosciences) foi utilizado em cada corte, sendo revelado com substrato cromogênico 3,3'diaminobenzidina (DAB) em marrom, e contracorado com Hematoxilina de Harris.

Deteção de células apoptóticas pelo método de TUNEL.

Cortes de 5 µm de fragmentos parafinados do fígado de animais de todos os grupos foram submetidos a processos de desparafinização e rehidratação, tratados com H₂O₂ 3% para inibição da peroxidase endógena, e proteinase K para recuperação antigênica. Foi utilizado o Kit de detecção de células em apoptose (Apoptag Plus Peroxidase *in situ*, Milipore), seguindo as instruções do fabricante. A imunomarcção foi revelada pelo DAB e contracorada com Methyl-green.

Análise estatística.

Para análise dos parâmetros percentual de tecido fibroso e quantificação dos níveis de hidroxiprolina, utilizou-se o teste T, e, quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). Para a contagem das células de Kupffer e proporção entre o parênquima lobular e não lobular, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn. Os softwares utilizados foram o Graph Pad Prism 5.0 e o Bioestat 5.3.

Resultados

Caracterização celular

Através da avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, foi possível observar que a fração celular obtida pelo método de separação imunomagnética caracterizou-se como uma população homogênea de monócitos positivos para os anticorpos CD11b e CD14 (Figura 1; Tabela 1).

Análises morfológica e morfométrica e dosagem de hidroxiprolina

A administração crônica de CCl₄ em camundongos C57Bl/6 causou alterações estruturais do fígado. Os achados macroscópicos foram caracterizados por áreas nodulares proeminentes, alterações vasculares e hepatomegalia. As alterações microscópicas demonstraram, em todos os grupos cirróticos submetidos à terapia (células CD11b⁺, CMMO totais, CMMO sem CD11b⁺ e salina), áreas de necrose (Figura 2A), deposição de tecido fibroso em torno dos nódulos hepáticos regenerativos (Figura 2B), proliferação das células ductulares (Figura 2C) e presença discreta de infiltrado inflamatório crônico de caráter predominantemente mononuclear nos espaços-porta e na região da veia centro-lobular. Os hepatócitos estavam tumefeitos e com degeneração gordurosa (Figura 2D). A presença de esteatose macrovacuolar e microvacuolar foi mais evidente nos grupos tratados com CMMO totais e CMMO sem CD11b⁺. Verificou-se com frequência a presença de Corpúsculo de Mallory em todos os grupos (Figura 2E).

A quantificação de tecido fibroso corado pelo sirius-red através da técnica de morfometria semi-automática demonstrou, dois meses após a terapia, que os animais cirróticos submetidos ao tratamento com células CD11b⁺ apresentaram uma diferença significativa da fibrose hepática (1,8%), quando comparados com as secções do fígado de camundongos tratados apenas com salina (3,7%) ($p < 0,05$). Os demais grupos submetidos à terapia celular não diferiram significativamente entre si (Figura 3). Com relação aos níveis de hidroxiprolina, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$), embora numericamente todos os tratamentos tenham apresentado valores inferiores ao grupo salina (Figura 4).

A análise morfométrica das células de Kupffer revelou que após dois meses do transplante celular, os grupos cirróticos submetidos aos tratamentos com células CD11b⁺ e CMMO totais apresentaram um aumento significativo dessas células, quando comparados ao grupo tratado com salina (Tabela 2). Porém, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os tratamentos, para os parâmetros parênquima lobular e não lobular (Tabela 2).

Imunoistoquímica

Através da técnica de imunomarcção de células em proliferação, foi evidenciada uma marcação menos expressiva nos fígados dos animais tratados com células CD11b⁺ e salina (Figuras 5A e 5D). Entretanto, nos grupos experimentais tratados com CMMO totais, CMMO sem CD11b⁺ e no grupo controle houve uma marcação mais expressiva (Figuras 5B, 5C e 5E). Na imunomarcção de células apoptóticas, pelo método de TUNEL, foi evidenciado que o tecido hepático dos

camundongos dos grupos CMMO totais e CMMO sem CD11b⁺ apresentou marcação mais intensa e maior frequência (Figuras 6B e 6C) quando comparados aos grupos tratados com células CD11b⁺, salina e controle (Figuras 6A, 6D e 6E).

Discussão

A terapia celular vem se tornando uma modalidade terapêutica atrativa para o tratamento de doenças hepáticas crônicas que pode proporcionar melhora da função do fígado, ou pelo menos, dar suporte funcional temporário até que um novo fígado esteja disponível para o transplante. Uma terapia que utilize uma população homogênea de células contribui para uma melhor compreensão da relação causa-efeito do transplante.

Em nosso estudo, as células CD11b⁺ foram consideradas como uma população homogênea de monócitos, sem contaminação significativa por outros tipos celulares, tais como linfócitos e granulócitos, como pôde ser observado na caracterização celular. A citometria de fluxo permitiu observar que as células CD11b⁺ obtidas pelo método de separação magnética apresentaram o mesmo perfil fenotípico de monócitos de medula óssea purificados por outras metodologias (22).

Trabalhos recentes têm demonstrado que células mononucleares de medula óssea proporcionam efeitos benéficos em modelos experimentais de lesão hepática, tanto de fase aguda, contribuindo para o aumento de sobrevida dos animais submetidos ao tratamento (23), como de fase crônica, com diminuição nos níveis de fibrose (15, 24). Nossos dados demonstraram que o transplante de células CD11b⁺ obtidas da fração mononuclear da medula óssea apresentou um efeito benéfico

sobre a fibrose em modelo experimental de cirrose hepática induzida em camundongos C57BL/6 pela administração de CCl₄ a 20%.

A diminuição nos níveis de fibrose observada pela análise morfológica e dosagem de hidroxiprolina, após o transplante de células CD11b⁺, reforça o papel anti-fibrogênico dessa população celular. Esses resultados corroboram trabalhos que demonstraram uma relação entre a população monócitos/macrófagos e a diminuição nos níveis de fibrose em modelos murinos de lesão hepática crônica (25). Estudos anteriores também relatam níveis menores de fibrose após terapia com CMMO totais. (15, 24).

Sabe-se que o processo de fibrólise (degradação do tecido fibroso) é regulado pela ação de collagenases, principalmente por metaloproteinases de matriz (MMP), produzidas e secretadas por diversas células, tais como células de Kupffer, células estreladas hepáticas e hepatócitos (26). A regulação da atividade das MMPs se dá pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) que promovem um equilíbrio entre produção e degradação de matriz extracelular (3,27). Em lesões hepáticas crônicas, observa-se um aumento na deposição de tecido fibroso, e esse fenômeno está associado à inibição da atividade das MMPs pelo aumento nos níveis de TIMPs (28). Trabalhos anteriores com modelos experimentais de lesão hepática crônica observaram que, após o transplante de células da medula óssea, houve uma diminuição da fibrose (15, 24, 29), onde as células infundidas foram encontradas em bandas de tecido fibroso e co-localizadas em áreas onde foi possível observar grande expressão de MMP-9. Dentre as células da medula óssea, essa propriedade anti-fibrótica foi atribuída às células da linhagem monócito/macrófago, que expressaram MMPs para a degradação do colágeno (29). Nossos dados sugerem

que a terapia com células CD11b⁺ pode ter contribuído, de forma parácrina, para a liberação de MMPs que promoveram um aumento na degradação das moléculas de colágeno e consequente redução nos níveis de fibrose, como também pode ter inibido a produção e liberação de TIMPs. A atuação das células CD11b⁺ pode ter ocorrido tanto de forma indireta, estimulando outras células a produzirem e liberarem MMPs ou inibindo a produção de TIMPs, como de forma direta, sendo a própria população infundida responsável pela secreção de enzimas collagenases.

Outra hipótese que pode estar associada à diminuição da fibrose em camundongos submetidos à terapia em nosso trabalho, seria a atuação das células CD11b⁺ nas vias de ativação das células estreladas hepáticas (CEHs). Para que as CEHs sejam ativadas e passem a produzir e depositar componentes da matriz extracelular (MEC) no parênquima hepático, uma cascata de citocinas pró-fibrogênicas é recrutada, dentre as quais se destaca o fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β) (3). Oliveira e colaboradores (2008) associaram a diminuição nos níveis de fibrose com queda significativa nos índices de TGF- β (24). Em modelos experimentais de lesão hepática, o aumento nos níveis de TGF- β é diretamente proporcional ao número de CEH ativadas, bem como aos níveis de fibrose hepática (3,30). O trabalho de Thomas e colaboradores (2011) demonstrou, também, aumento na expressão de MMPs e diminuição nos níveis de TGF- β , após infusão de macrófagos obtidos através da cultura condicionada de células precursoras (31).

Também foi possível observar, através de análises morfológicas, que os animais cirróticos submetidos à terapia com células CD11b⁺ apresentaram um aumento significativo no número de células de Kupffer no tecido hepático, quando

comparados aos animais cirróticos tratados com salina. As células de Kupffer são monócitos residentes do fígado, localizados nos sinusóides hepáticos no interior do espaço de Disse (32). Nas doenças hepáticas, essas células têm a função fagocítica e liberam citocinas, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), ambos os mediadores importantes da resposta inflamatória e fibrogênese hepática (33). Existem evidências a partir de estudos experimentais que as células de Kupffer são derivadas da medula óssea (33). Sabendo que as células CD11b⁺ obtidas por separação magnética constitui de uma população homogênea de monócitos, podemos sugerir que o aumento no número de células de Kupffer nos fígados dos camundongos submetidos à terapia celular foram originados pela diferenciação das células CD11b⁺ infundidas, que migraram para as áreas de lesão e se diferenciaram em células de Kupffer.

Uma terapia eficaz para as doenças do fígado deve associar redução dos níveis de fibrose e consequente aumento da regeneração hepática, ou seja, ativação da atividade proliferativa de hepatócitos, no intuito de recuperar a massa hepática perdida no processo de lesão tecidual (34). Em nosso estudo, a presença de células em proliferação foi mais evidente nos animais que receberam CMMO totais e CMMO sem CD11b⁺, sugerindo que células com perfil diferente das células CD11b⁺ possam estar envolvidas nos processos de proliferação celular. Trabalhos anteriores mostraram que o transplante de células totais da medula óssea promoveu aumento significativo no número de células ovas no fígado – células progenitoras de hepatócitos (24).

Trabalhos que investigam o potencial terapêutico de células da medula óssea associam a eficácia do tratamento à alterações nos níveis de apoptose nos fígados

de animais submetidos ao transplante celular. Em nosso trabalho, não foi evidenciado marcação expressiva para apoptose nos animais cirróticos submetidos à terapia com células CD11b⁺, ao contrário de estudos anteriores, que detectaram aumento significativo nos níveis apoptóticos após terapia com macrófagos obtidos de monócitos cultivados, e associaram a uma co-marcação para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), específico para CEHs, sugerindo que estas células fibrogênicas foram sinalizadas para morte por apoptose após o transplante de monócitos. (31).

Diante de nossos achados, podemos sugerir que os efeitos anti-fibrogênicos associados à terapia com células CD11b⁺ se deve ao perfil de ativação que as células infundidas assumiram ao migrarem para as áreas de lesão. O perfil de ativação de subpopulações de monócitos M2 é uma forma alternativa que está associada ao reparo tecidual, contribuindo para a degradação de tecido fibroso (33,35). Manuelpillai e colaboradores (2012) associaram a regressão da fibrose hepática ao aumento dos níveis de expressão de marcadores de subpopulações de monócitos M2, reforçando a participação destas em processos de regeneração hepática (36).

Conclusão

A separação das células CD11b⁺ pelo método imunomagnético é considerada viável, e o transplante destas células para fígados cirróticos é capaz de reduzir os níveis de fibrose, sugerindo possível aplicação terapêutica desta população celular no tratamento das hepatopatias crônicas. Sendo assim, mais estudos são

necessários para sustentar e reforçar os efeitos da terapia, bem como conduzir os estudos de fase clínica e determinar a eficácia da terapia com células autólogas nas doenças crônicas do fígado.

Agradecimentos

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE); Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM/FIOCRUZ-BA); Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Fundação de amparo à ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

Referências

- 1** Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. (1978) The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. J Clin Pathol 31: 395-414.
- 2** Bataller R, Brenner DA. (2005) Liver fibrosis. J Clin Invest 115: 209-218.
- 3** Schuppan D, Afdhal NH. (2009) Liver Cirrhosis. Nat Inst of Health 371: 838–851.
- 4** Taylor RM, Daven T, Munoz S, Han SH, McGuire B, et al. (2006). Us acute liver failure study group. Fulminant hepatitis A virus infection in the United States: Incidence, prognosis, and outcomes. Hepatology 44: 1589-1597.
- 5** Lok ASF, McMahon BJ. (2007) Chronic Hepatitis B. Hepatology 45(2): 507-539.

- 6** Booth JC, O'Grady J, Neuberger J. (2001) Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 49(1): 1–21.
- 7** Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kistens L. (2006) Human Schistosomiasis. *The lancet* 368: 1106-1118.
- 8** Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, et al. (2005) Acute Liver Failure Study Group. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 42: 1364-1372.
- 9** Pinzani M, Rosselli M, Fellow R, Zuckermann M, Surgeon C. (2011) Liver cirrhosis. *Best Pract Res Cl Ga* 25: 281–290.
- 10** Iredale JP. (2007) Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 117: 539-548.
- 11** Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, et al. (2007) Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *W J Gastr* 13: 1067-1073.
- 12** Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. (2006) Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Phys* 74: 767-776.
- 13** Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, et al. (2008) Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 47: 1634 – 1643.
- 14** Belardinelli MC, Pereira FS, Baldo G, Vicente Tavares, AM, Kielling CO, et al. (2008) Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen- induced hepatic failure. *Toxicology* 247: 1-5.

- 15** Oliveira SA, De Freitas Souza BS, Sá Barreto EP, Kaneto CM, Neto HA, et al. (2011) Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. *Cytotherapy* 14: 339-349.
- 16** Lodi D, Lanniti T, Palmieri B. (2011) Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 9.
- 17** Yan L, Han Y, Wang J, Liu J, Hong L, Fan D. (2007) Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes. *Am J Hematol* 82: 949-954.
- 18** Ehnert S, Seeliger C, Vester H, Schmitt A, Saidy-Rad S, et al (2011) Autologous serum improves yield and metabolic capacity of monocyte-derived hepatocyte-like cells: possible implication for cell transplantation. *Cell Transp* 20(9): 1465-1477.
- 19** Junqueira LCU, Bogdanos G, Brentani RR. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochem J* 11: 447-455.
- 20** Engelman MFB, Neto JG, Andrad, CHV, Hernandez R, Goulart LBNT. (2001) Estudo morfométrico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 45 (2).
- 21** Bergman I, Loxley R. (1963) Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Ann Chem* 35: 1961-1965.
- 22** Vieira LM, Dusse S, Filho OAM, Carvalho MG. (2003) Flow cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 25(3): 141-147.

- 23** Souza BSF, Nascimento RC, Oliveira SA, Vasconcelos JF, Kaneto CM, Carvalho LFPP, Ribeiro-dos-santos R, Soares MBP, Freitas LAR. (2012) Transplantation of bone marrow cells decreases tumor necrosis factor- production and blood – brain barrier permeability and improves survival in a mouse model of acetaminophen-induced acute liver disease. *Citotherapy* 1: 1-11.
- 24** Oliveira SA; Souza BS, Guimarães-Ferreira CA, Barreto ES, Souza SC, Freitas LA, Ribeiro-dos-Santos R, Soares MB. (2008) Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni* *World J Gastroenterol* 14(38): 5842-5850
- 25** Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, et al. (2001) Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 36: 653–659.
- 26** Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. (2002) Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: 793–807.
- 27** Shuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. (2001) Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 21: 351-372.
- 28** Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. (2013) Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. *Sci Transl Med* 5: 1-17.
- 29** Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, et al. (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 115(1): 56–65.

- 30** Subeq YM, Ke CY, Lin NT, Lee CJ, Chiu YH, et al. (2011) Valsartan decreases TGF-beta1 production and protects against chlorhexidine digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. *Cytokine* 53: 223–230.
- 31** Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, et al. (2011) Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration and function. *Hepatology* 53 (6): 2003-2015.
- 32** Loureiro-Silva MR, Molina HM, Borges DR. (1999) Substâncias vasoativas e a modulação do sistema microvascular hepático. *Rev Ass Med Brasil* 45 (3): 206-216.
- 33** Villanueva CJ, Tontonoz P. (2010) Licensing PPAR γ to work in macrophages. *Immunity* 33: 647-649.
- 34** Forbes SJ, Parola M. (2011) Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25 (2): 207-217.
- 35** Kisseleva T, Brenner DA. (2011) Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Prac R Clin Gastroenterol* 25: 305–317.
- 36** Manuelpillai U, Lourensz D, Vaghjiani V, Tchongue J, Lacey D, et al. (2012) Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Induces Markers of Alternative Macrophage Activation and Reduces Established Hepatic Fibrosis. *Plos One* 7 (6): 1-11.

Figuras e legendas

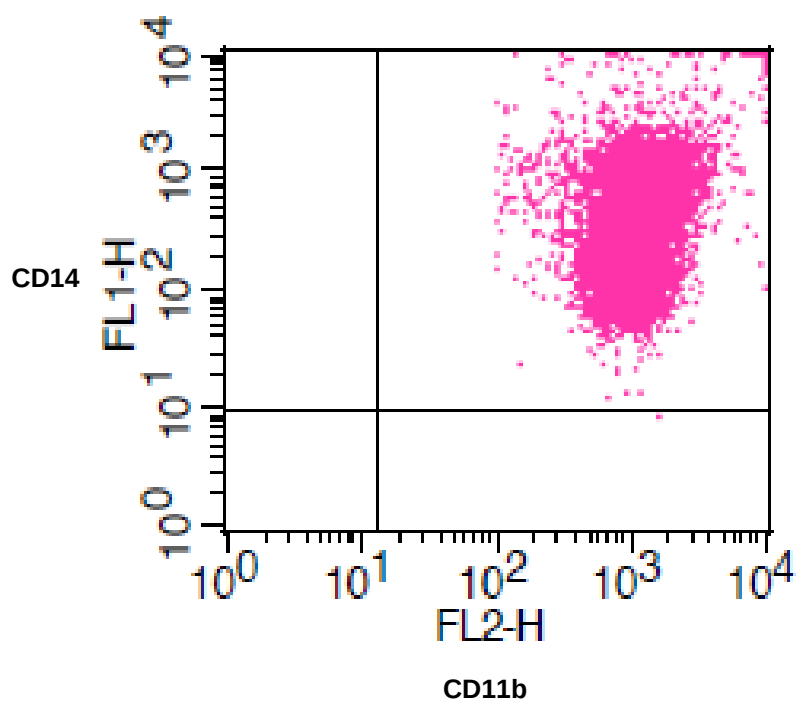


Figura 1. Gráfico representativo da imunofenotipagem por citometria de fluxo das células CD11b⁺ obtidas por separação imunomagnética para os marcadores CD11b e CD14.

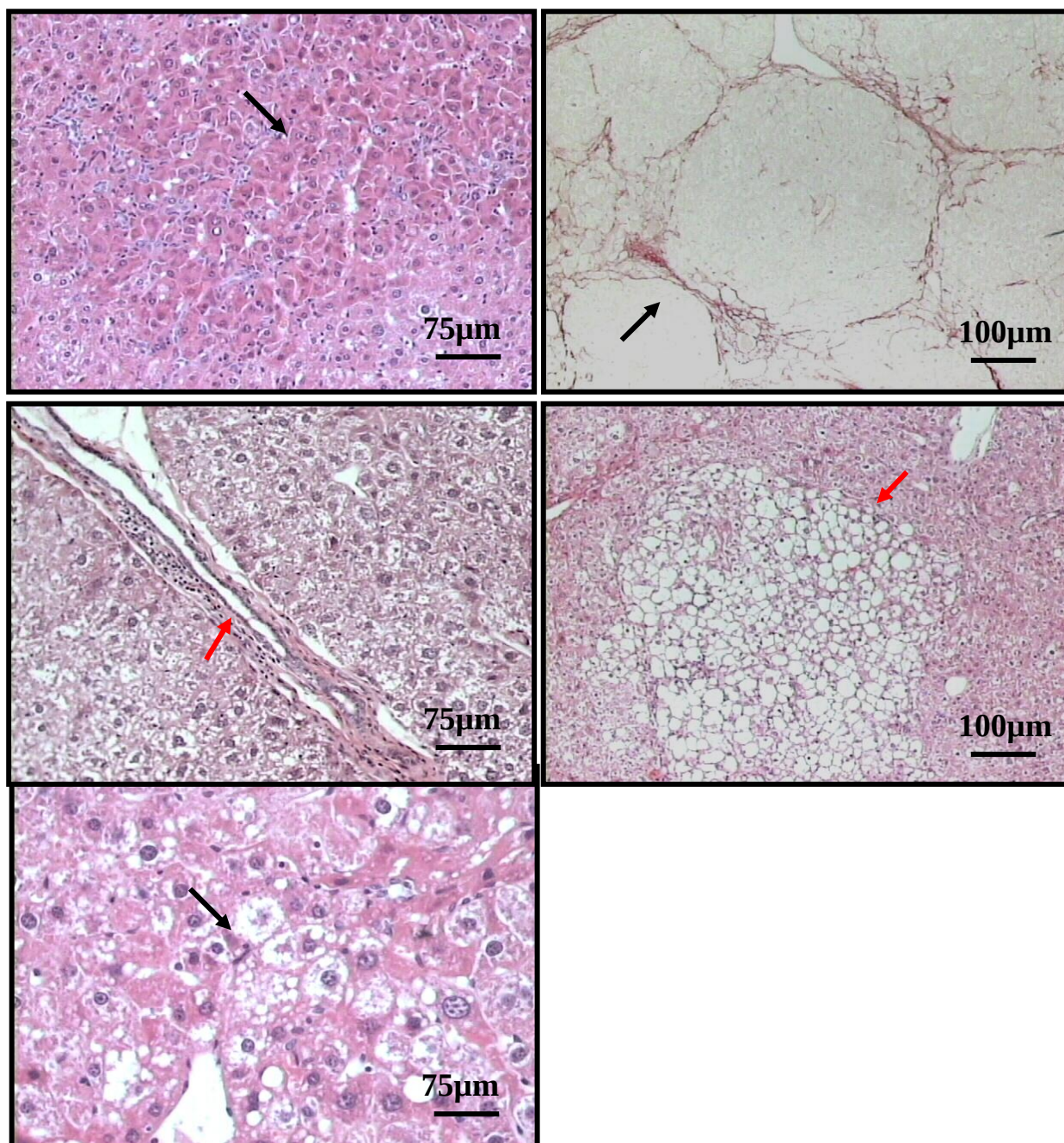


Figura 2. Fotomicrografias do tecido hepático de camundongos submetidos à terapia celular, com presença de necrose hepatocelular (A, H&E), formação de nódulos regenerativos delimitados por tecido fibroso (B, sirius red), proliferação ductular (C, H&E), esteatose macrovacuolar e microvacuolar (D, H&E) e corpúsculo de Mallory (E, H&E).

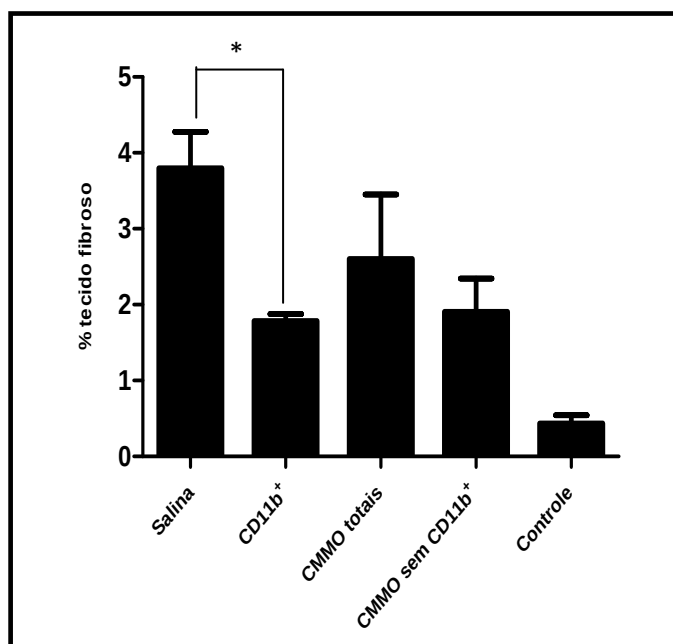


Figura 3. A análise morfométrica demonstrou que, dois meses após o transplante, os animais cirróticos submetidos à terapia com células CD11b⁺ apresentaram redução significativa (* = $p < 0,05$) no percentual de tecido fibroso quando comparados ao grupo tratado com salina.

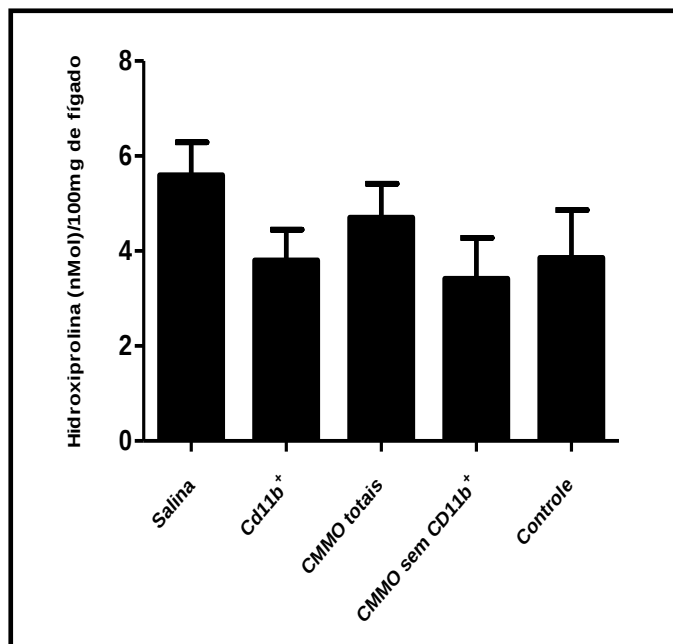


Figura 4. O ensaio bioquímico demonstrou que, dois meses após o transplante, os animais cirróticos submetidos à terapia com células CD11b⁺ apresentaram diminuição nos níveis de Hidroxiprolina, em relação ao grupo cirrótico tratado com salina.

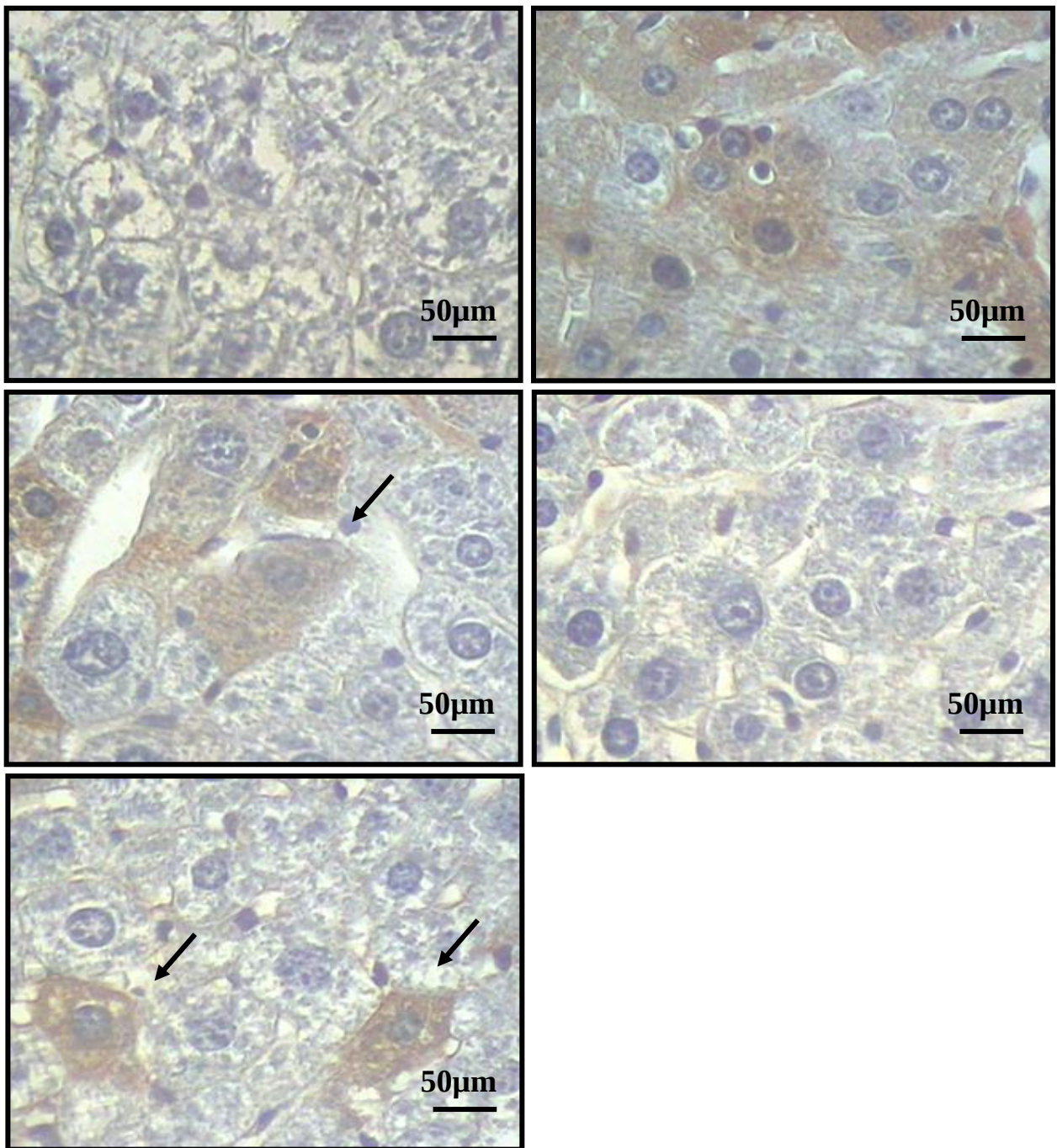


Figura 5. Fotomicrografias da imunomarcação para proliferação celular (PCNA) no tecido hepático dos grupos experimentais: grupo cirrótico tratado com células CD11b⁺ (A); grupo cirrótico tratado com CMMO totais (B); grupo cirrótico tratado com CMMO sem CD11b⁺ (C); grupo cirrótico tratado com salina (D); e grupo controle (E).

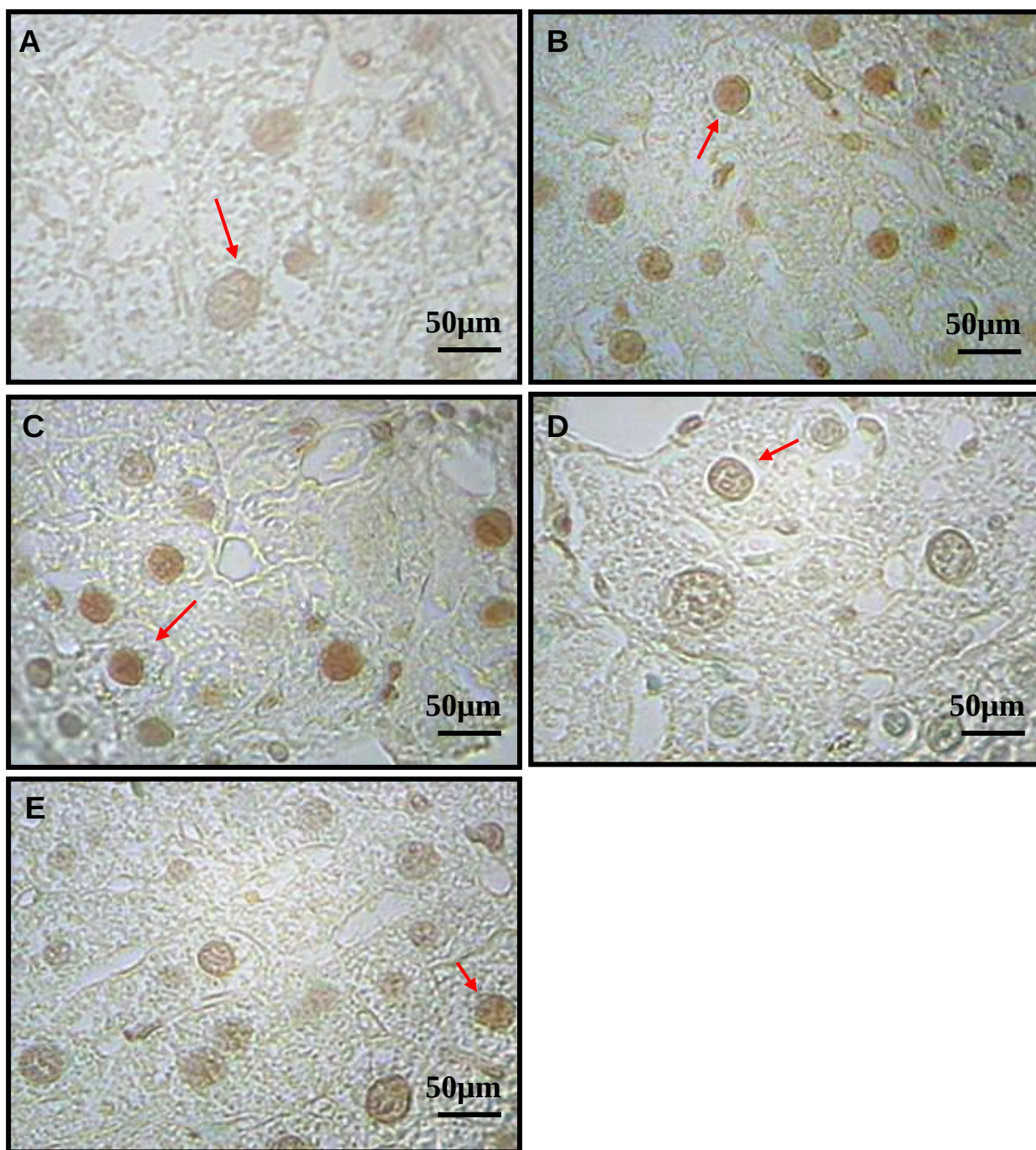


Figura 6. Fotomicrografias da Imunoistoquímica para células em apoptose no tecido hepático dos grupos experimentais: grupo cirrótico tratado com células CD11b⁺ (A); grupo cirrótico tratado com CMMO totais (B); grupo cirrótico tratado com CMMO sem CD11b⁺ (C); grupo cirrótico tratado com salina (D); e grupo controle (E).

Tabelas

Tabela 01. Valores percentuais dos marcadores para as células obtidas por separação imunomagnética.

Fenótipo	Células obtidas por separação imunomagnética (%)
CD11b ⁺	99,12
CD11b ⁺ + CD14 ⁺	97,99
CD34 ⁺	29,88
Ly-6A ⁺	12,5
CD45 ⁺	29,89

Tabela 02. Média ($\pm$ desvio-padrão) de Células de Kupffer e da contagem morfométrica do parênquima lobular e não-lobular do fígado.

Grupos Experimentais	Células de Kupffer	Parênquima Lobular*	Parênquima não-lobular*
Salina	0.9 $\pm$ 0.29a	91.86 $\pm$ 5.03a	9.57 $\pm$ 4.41a
Células CD11b ⁺	3.04 $\pm$ 0.52b	88.66 $\pm$ 3.21a	11.18 $\pm$ 2.95a
CMMO totais	3.06 $\pm$ 0.84b	87.21 $\pm$ 5.10a	12.78 $\pm$ 5.10a
CMMO sem CD11b ⁺	1.46 $\pm$ 0.44a	89.19 $\pm$ 6.01a	10.80 $\pm$ 6.01a
Controle	1 $\pm$ 0.15a	93.39 $\pm$ 1.82a	6.60 $\pm$ 1.81a
	P 0.0007	P 0,1227	P 0,1629

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($P > 0,05$).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

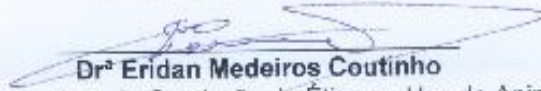
Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado: **"INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS CRÔNICAS."** protocolado sob o Nº 15/2011, coordenado pelo (a) pesquisador(a) **SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião de 26/05/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até o mês de maio de 2015.

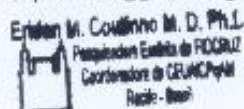
Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie - linhagem	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS C57BL/6	320
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS C57BL/6 E GFP	480
TOTAL	800

We certify that the project entitled **"INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO NO TRATAMENTO DE LESÕES HEPÁTICAS CRÔNICAS."** (CEUA Protocol Nº 15/2011), coordinated by **SHEILLA ANDRADE DE OLIVEIRA** according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on may 26, 2011. In the present version this project is licensed and valid until may 2015

Recife (PE, Brazil) 30 may 2011.


Drª Eridan Medeiros Coutinho

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ



Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2800 Fax: (81) 3413-1911
www.cricam.fiocruz.br