

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PRÉ-CLÍNICOS
DE TERAPIA CELULAR EM MODELOS ANIMAIS DE
LESÃO HEPÁTICA AGUDA E CRÔNICA**

Guilherme Baldo

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Profa. Dra. Ursula Matte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-
Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, Janeiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Giuliani, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança depositada, pela atenção e pelo exemplo de lutas e conquistas.

À Dra Ursula Matte, pelo exemplo de brilhantismo e incondicional amizade. Obrigado pela confiança, disponibilidade e pelas discussões científicas. Obrigado também por contribuir imensamente para meu crescimento intelectual, profissional e como pessoa.

Aos colegas do Centro de Terapia Gênica, pela amizade, carinho e companheirismo.

Aos colegas dos laboratórios de Hepatologia Experimental e Hepatologia e Fisiologia, coordenados pelas Dra Themis Reverbel da Silveira e Norma Marroni, pela amizade e discussões que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos (que por sorte são muitos para serem mencionados aqui), pela amizade sincera, pelo encorajamento e incentivo.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, pelo conhecimento adquirido.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela infra-estrutura essencial ao desenvolvimento deste trabalho. Principalmente aos laboratórios do Centro de Pesquisas e do Serviço de Genética Médica.

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

A toda minha família, em especial aos meus pais, pelo estímulo e apoio incondicional, mesmo à distância.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	2
Lista de tabelas	3
Lista de figuras	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
1.1 LESÃO HEPÁTICA	7
1.1.1 Insuficiência hepática aguda (IHA)	7
1.1.1.1 Modelos animais de IHA	9
1.1.1.2 Tetracloreto de Carbono	10
1.1.2 Lesão Hepática Crônica	10
1.1.2.1 Cirrose Biliar Secundária	11
1.1.2.2 Modelo animal de ligadura de ducto biliar	12
1.2. TERAPIA CELULAR	13
1.2.1 Células-Tronco	15
1.2.1.1 Células-Tronco Embrionária	16
1.2.1.2. Células-Tronco adultas	16
1.2.2 Células Mononucleares de medula óssea	19
2. Objetivos	20
3. Artigo 1: <i>Bone marrow cells improve survival and induce hepatocyte proliferation in rats after CCl₄- induced acute liver damage</i>	23
4. Artigo 2: <i>Bone marrow cells reduce collagen deposition in rats with common bile duct ligation</i>	46
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	82
7. BIBLIOGRAFIA	84

Lista de abreviaturas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CT	Célula-tronco
DAPI	4',6' Di Amidino-2-Fenil Indol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FA	Fosfatase alcalina
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
IHA	Insuficiência hepática aguda
LDB	Ligadura de ducto biliar comun
MMP-9	Metaloproteinase de matriz tipo 9
MMP-13	Metaloproteinase de matriz tipo 13
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato salino
SDF-1 α	<i>Stromal derived factor 1 alpha</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Terapia celular
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>

Lista de tabelas:

Tabela 1: Etiologia da insuficiência hepática aguda	8
Tabela 2: Modelos animais de Insuficiência Hepática Aguda	9
Tabela 3: Ensaios clínicos envolvendo transplante de células de medula óssea e lesão hepática crônica	80

Lista de figuras:

Figura 1: Modelo animal de ligadura de ducto biliar comum e seus efeitos	13
Figura 2: Número de estudos publicados no Medline (www.pubmed.com) tratando do tema terapia celular (cell therapy) ao decorrer dos últimos 15 anos	14
Figura 3: Caracterização da população celular obtida na purificação de células de medula óssea por Gradiente de Ficoll. As células foram coradas usando técnica de May Grunvald-Giemsa. As letras na figura indicam um: L- linfócito. G- granulócito. CI- célula imatura. Aumento: 2000X	70

RESUMO

Neste trabalho verificamos o efeito da administração de células mononucleares de medula óssea murinas em ratos submetidos a modelos de lesão hepática aguda (por CCl₄) e crônica (por ligadura de ducto biliar comum).

No modelo de lesão hepática aguda as células foram injetadas através da veia porta 24 horas após a administração de 1,25 mL/kg de CCl₄. Nos ratos submetidos à LDB a injeção foi realizada 14 dias após a lesão, através da veia mesentérica. Em ambos casos, foram injetadas 1×10^6 células mononucleares de medula óssea diluídas em 0,2 mL de PBS. A sobrevivência, níveis de ALT e avaliação histológica foram analisados no modelo agudo, 72 horas após lesão. A quantificação da fibrose hepática, ALT, AST, FA, peroxidação lipídica e avaliação histológica foram realizadas no modelo crônico 14 e 28 dias após a lesão.

Pode-se observar um aumento na sobrevivência de ratos tratados pós IHA, com aumento do número de mitoses no tecido hepático e diminuição nos níveis de ALT 72 horas após a lesão. No modelo de LDB houve uma redução na deposição de colágeno após o tratamento e uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina. Os outros parâmetros não apresentaram alterações. Em ambos estudos pode-se observar a presença das células transplantadas no fígado dos animais.

Nossos dados sugerem um efeito benéfico do transplante celular para as duas situações, no entanto, os resultados encontrados indicam mecanismos de ação diferentes destas células em resposta aos danos induzidos. Os resultados deste trabalho juntamente com estudo destes mecanismos podem ajudar no desenvolvimento de futuros protocolos clínicos envolvendo esta abordagem terapêutica.

ABSTRACT

In this work we verified the effects of bone marrow mononuclear cell transplantation in animal models of acute and chronic liver disease induced by carbon tetrachloride and common bile duct ligation, respectively.

In the acute liver damage model, cells were injected through the portal vein of rats 24 hours after damage, induced by 1.25 mL/kg of CCl₄. Rats with common bile duct ligation were transplanted with bone marrow cells 14 days after surgery through the mesenteric vein. In both protocols 1×10^6 cells were injected in 0.2 mL of PBS. Survival, ALT levels and histological evaluation were the main endpoints of the CCl₄ protocol, while liver fibrosis, ALT, AST, ALP, lipid peroxidation and histologic evaluation were studied in the chronic disease model.

In the CCl₄ model, we were able to verify an increase in the survival rate of treated animals with a two fold raise in liver mitotic activity and reduced ALT levels 72 hours after damage. In the common bile duct ligation model there was a significant reduction in fibrotic area in cell treated animals. Besides, a significant reduction in alkaline phosphatase levels was also observed. Other parameters did not show any differences among the groups. In both protocols it was possible to detect the presence of donor-derived cells in livers from treated rats.

Our data suggest a benefit from cell therapy in both situations. Moreover, our findings indicate that these cells may act through different mechanisms in response to different liver insults. The results obtained in this work, combined to further studies may help in developing adequate and safe clinical protocols using cell therapies in liver disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1 LESÃO HEPÁTICA

O fígado possui importantes funções metabólicas que visam à manutenção da homeostase do organismo. Dessa forma, ele é um órgão-chave nos processos de síntese e depuração de substâncias, no metabolismo de carboidratos e lipídios, síntese de diversas proteínas, conversão da amônia em uréia e na metabolização de xenobióticos. Lesões neste órgão, portanto, possuem importantes implicações sistêmicas associadas (Stolz, 2002).

A lesão no tecido hepático pode ser basicamente de dois tipos. Ela pode ocorrer de forma aguda, podendo gerar a insuficiência do órgão num curto prazo de tempo, com a perda das funções metabólicas. Ou de forma crônica, o que leva a uma série de alterações na arquitetura hepática, ocasionando fibrose do tecido e, em última instância, cirrose.

1.1.1 Insuficiência Hepática Aguda

Poucas situações em medicina têm se mostrado tão intrigantes quanto a insuficiência hepática aguda (IHA), uma síndrome caracterizada pela rápida perda das funções hepáticas com sérias conseqüências sistêmicas, as quais incluem coagulopatia, encefalopatia, coma, hipoglicemia, falência renal, sepse e falência múltipla de órgãos (Polson e Lee, 2005). Embora nas últimas décadas tenha-se conseguido avanços no manejo clínico dos pacientes com essa síndrome, o único tratamento eficaz ainda é o transplante hepático (Van Thiel et al, 2001). Atualmente, são relatadas taxas de

sobrevida espontânea entre 5 e 60%, dependendo da etiologia (Lorenti et al, 2005). Com o transplante de fígado tem-se atingido 80 a 90% de sobrevivência. Contudo, a falta de órgãos disponíveis em tempo hábil dificulta o emprego do transplante como opção terapêutica, e a mortalidade em lista atinge 40% (Polson e Lee, 2005). O desenvolvimento de terapêuticas alternativas de suporte durante a insuficiência hepática poderia prolongar a sobrevida, possibilitando uma ponte para o transplante ou a recuperação espontânea.

Entre as principais causas de IHA estão os agentes biológicos, como hepatites virais, e os químicos, como drogas hepatotóxicas (Tabela 1). Em nosso meio, a hepatite fulminante por vírus A é a causa mais comum de IHA em crianças. Entre 1996 e 2006 o Programa de Transplante Hepático Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre contabilizou 33 casos de crianças com IHA (sete destes foram submetidos ao transplante hepático), sendo 12 (36%) delas por vírus A (Johann et al, 2006). Na Argentina, 60% dos casos pediátricos de IHA submetidos a transplante hepático são por vírus A (Centeno et al., 2002). Em países europeus, por outro lado, a IHA é predominantemente relacionada a causas metabólicas ou a intoxicações por medicamentos, como o paracetamol (Lee et al., 2005). Em parte isso se deve ao uso dessa substância em casos de tentativa de suicídio (Shiodt et al, 1997).

Tabela 1: Etiologia da insuficiência hepática aguda

Etiologia	Incidência	Observações
Viral	18-75 %	Hepatites virais, citomegalovírus, adenovírus, vírus Epstein Barr, outros.
Reações idiossincráticas a drogas	12-14 %	Tetraciclina, metildopa, valproato de sódio, alopurinol, antihiperlipidêmicos, etc.
Paracetamol	10-37 %	
Outras etiologias	11-19 %	Insuficiência hepática da gravidez, doença de Wilson, sepse, deficiência de alfa-1-antitripsina, toxinas como CCl ₄ .
Desconhecida	12-18 %	

Adaptado de Van de Kerkhove et al, 2004

1.1.1.1 Modelos animais de IHA

O desenvolvimento de modelos animais de IHA tem seguido duas abordagens principais, quais sejam: procedimentos cirúrgicos e farmacológicos (Tabela 2). Além disso, outros modelos animais têm recentemente sido relatados, como animais nocaute (*Knockout*) para uma série de genes e também modelos de hepatite de origem viral. Infelizmente, o uso de agentes infectantes na indução de IHA experimental tem apresentado sucesso limitado.

Tabela 2: Modelos animais de Insuficiência Hepática Aguda

	<i>Modelo</i>	<i>Espécies</i>	<i>Reproductibilidade</i>	<i>Reversibilidade</i>
Cirúrgico	Hepatectomia total	Porco, cachorro, rato	Boa	Não
	Hepatectomia parcial	Porco, rato	Boa	Sim
	Devascularização total	Porco, cachorro, rato	Boa	Não
	Devascularização parcial	Porco	Parcial	Potencial
Farmacológico	CCl ₄	Rato	Parcial	Potencial
	Paracetamol	Porco, Cachorro, Coelho	Parcial	Potencial
	Tioacetamida	Coelho, Camundongo	Boa	Potencial
	Galactosamina	Cachorro, Coelho, Rato	Parcial	Potencial
Outros	Hepatite viral	Coelho	Parcial	Potencial

Adaptado de Bélanger e Butterworth, 2005

As técnicas cirúrgicas usadas incluem ressecção de lóbulos hepáticos e devascularização do fígado. Esses modelos parecem ser mais reprodutíveis quando comparados a modelos farmacológicos, e não geram toxicidade extra-hepática. Porém, essa abordagem dificilmente permite a recuperação do animal. Além disso, não ocorre a

liberação de mediadores inflamatórios produzidos por hepatócitos após o dano, limitando a sua comparação com situações clínicas (Newsome et al, 2000).

Diversas substâncias hepatotóxicas têm sido usadas no desenvolvimento de modelos experimentais de IHA. As mais freqüentemente usadas são o paracetamol, a tioacetamida e o tetracloreto de carbono (CCl_4). Estes modelos possuem uma variabilidade maior quando comparados aos modelos cirúrgicos, mas parecem refletir melhor os achados clínicos, tais como a encefalopatia (Bélanger e Butterworth, 2005).

1.1.1.2 Tetracloreto de carbono

O efeito hepatotóxico do CCl_4 já é conhecido desde a década de 60. Seu mecanismo de ação envolve sua metabolização ao radical triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) pelo citocromo P450. Este liga-se a macromoléculas, aumentando a peroxidação lipídica e alterando a homeostase do cálcio intracelular (Recknagel et al, 1989). Estudos da última década demonstraram que o CCl_4 pode induzir morte celular não somente por necrose, mas também através de apoptose (Shi et al, 1998). Fragmentação do DNA nuclear também foi observada neste estudo. O dano hepático agudo por CCl_4 se reflete histologicamente através de marcada necrose na região centrilobular, esteatose microvesicular e forte presença de infiltrado inflamatório no tecido hepático (Rahman and Hodgson, 2000).

1.1.2 Lesão Hepática Crônica

As doenças hepáticas crônicas são de alta prevalência e incidência em todo o mundo, e as suas causas mais freqüentes relacionam-se aos vírus das hepatites B e C, ao

alcoolismo, a doenças auto-imunes, a alterações metabólicas, tóxicas ou colestáticas. Na lesão hepática crônica, uma série de eventos mediados por citocinas leva à ativação da célula estrelada hepática, à deposição de colágeno e à fibrose do tecido, a qual pode evoluir para cirrose (Parsons et al, 2007).

1.1.2.1. Cirrose biliar

Na cirrose biliar ocorre impedimento funcional ou mecânico ao fluxo biliar. Esta é uma enfermidade crônica e difusa do fígado com alterações na sua estrutura e função, seja intra ou extra-hepática. Pode ser considerada uma possível complicação tardia da obstrução prolongada das vias biliares extra-hepáticas (Esteller & Cordero, 1998). Essa doença é acompanhada pela dificuldade de eliminação da bile, pela destruição do parênquima hepático e pela fibrose progressiva (Rojkind & Ponce-Noyola, 1982)

A obstrução crônica da via biliar extra-hepática pode determinar a estase biliar e áreas focais de necrose centrilobular e periportal, além de proliferação e dilatação dos ductos e canálculos biliares dos espaços porta. Também ocorre colangite estéril ou infecciosa com infiltração de polimorfonucleares, edema e fibrose dos espaços porta. A lesão é acompanhada de fenômenos degenerativos e regenerativos do parênquima residual, com a formação de nódulos (Abdel Aziz, 1990).

A citotoxicidade dos ácidos biliares é atribuída a diversos mecanismos, incluindo as suas propriedades detergentes, a alteração da homeostase do cálcio intracelular, a depleção de ATP e ao dano mitocondrial. Outros trabalhos sugerem que na patogênese do dano colestático hepático participam as espécies ativas de oxigênio (Parola, 1996; Pastor et al, 1997). Há alterações nos mecanismos antioxidantes, que levam a um desequilíbrio entre os processos oxidativos e antioxidativos, o que estimula

o processo de peroxidação lipídica, provocando lesões hepáticas. Já está claramente demonstrada a participação dos radicais livres na fisiopatologia da doença causada por estase biliar (Forestier, 1997).

Em crianças, a atresia biliar e a fibrose cística são as principais causas de cirrose biliar secundária. Em adultos, as causas mais frequentes são coledocolitíase, estenoses benignas ou malignas da via biliar, cistos de colédoco, trauma pós-cirúrgico da via biliar, pancreatite crônica, tumores pancreáticos e colangite esclerosante primária (Friedman & Schiano, 2004).

1.1.2.2 Modelo animal de ligadura de ducto biliar

A obstrução prolongada do ducto biliar em ratos (Figura 1) é um modelo experimental para induzir fibrose e cirrose biliar secundária, sendo que se estabelecem as características próprias da patologia em torno de 28 dias (Kontouras et al, 1984). Nesse período, a obstrução provoca aumento do ducto biliar, edema, reações inflamatórias agudas pelo refluxo biliar e aparecimento de fibrose periportal. Esta última deve-se a alterações na síntese e degradação de proteínas matriciais como colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, causando desorganização da arquitetura natural do parênquima. De acordo com o modelo desenvolvido por Kontouras e colaboradores (1984), em 28 dias, 50 a 80% dos animais sobreviventes desenvolvem cirrose biliar secundária associada com colestase e ascite.

Estudos prévios demonstraram que a indução de dano hepático crônico através da ligadura de ducto biliar comum simula a doença humana pelas alterações decorrentes da reação inflamatória causada pelo refluxo biliar e pela desorganização da arquitetura

natural do parênquima, com áreas inflamatórias, de deposição de colágeno e de fibrose (Pastor et al, 1997).

Em ratos submetidos ao modelo de obstrução do ducto biliar comum, observa-se hepatomegalia e esplenomegalia, que acontecem principalmente pelo aumento do tecido conjuntivo, assim como do epitélio biliar e, paralelamente, pode ocorrer a hipertensão portal que se manifesta pela dilatação das veias esplênicas (Yaari et al 1992).

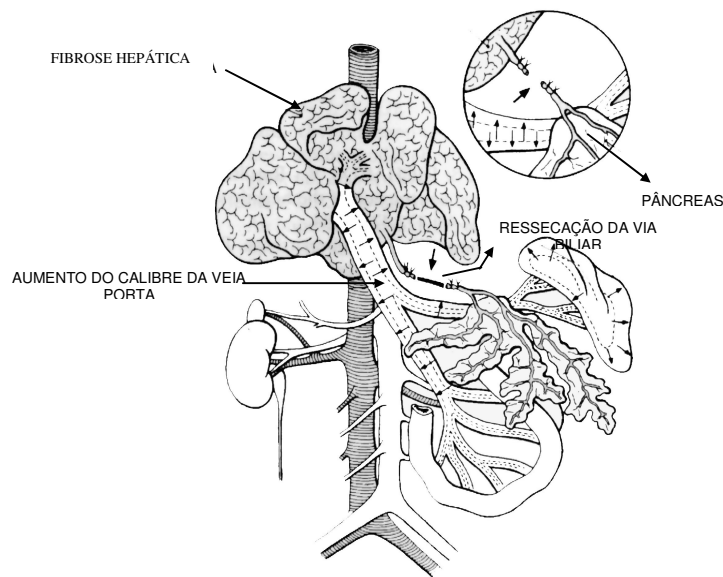


Figura 1: Modelo animal de ligadura de ducto biliar comum e seus efeitos (Adaptado de Fernandes e Mies, 1998)

1.2 TERAPIA CELULAR

Com o aumento da expectativa de vida das populações de uma forma geral, estima-se que cresça o número de indivíduos afetados por doenças crônico-degenerativas. Essas doenças representam um enorme custo social, e também um considerável gasto nos sistemas de saúde. As terapias celulares (TC) têm sido consideradas possíveis alternativas para oferecer cura e/ou interrupção da progressão de

algumas das doenças para as quais a medicina atual não oferece recursos terapêuticos efetivos (Mendez-Otero et al, 2007).

A TC é definida como a abordagem terapêutica que visa à recuperação/regeneração de tecidos através do uso de diferentes tipos celulares ou grupos de células. Suas formas clássicas incluem o transplante de medula óssea (hoje chamado de transplante de células-tronco hematopoiéticas) e mesmo a transfusão de sangue. O transplante de células diferenciadas (como o transplante de hepatócitos ou de ilhotas pancreáticas), indiferenciadas (células-tronco) e a engenharia de tecidos vêm crescendo como novas formas dessa terapia (Figura 2).

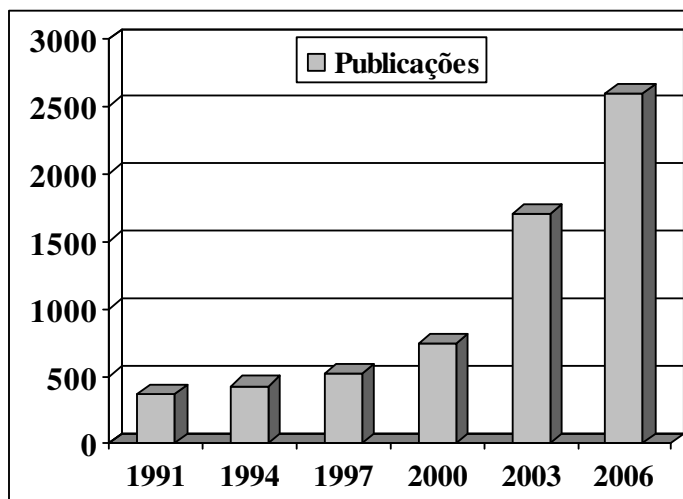


Figura 2: Número de estudos publicados no *Medline* (www.pubmed.com) tratando do tema terapia celular (*cell therapy*) ao decorrer dos últimos 15 anos.

No campo da hepatologia, o transplante de hepatócitos tem sido realizado para uma série de situações, englobando desde doenças genéticas até falência hepática fulminante (Fischer e Strom, 2006). Outras abordagens recentemente descritas são a utilização de fígados bioartificiais (Kobayashi et al, 2003) e o uso de células tronco (Allen et al, 2005).

O transplante de hepatócitos teve seu primeiro relato de sucesso em 1998, num paciente com síndrome de Criegler-Najjar, uma enfermidade metabólica em que há uma deficiência da enzima bilirrubina uridina glucuronosil transferase (Fox et al, 1998). Durante a última década, um intenso trabalho de investigação em animais e recentes estudos clínicos sugerem que o transplante de hepatócitos pode ser útil para o tratamento de enfermidades metabólicas e como uma “ponte” para determinados pacientes com falência hepática fulminante à espera de um fígado (Fischer e Strom, 2006). Essa abordagem requer mínima intervenção, mantém intacta a arquitetura hepática e permite restaurar a função deficiente ou alterada sem necessidade do transplante completo do órgão. Além disso, em teoria, ainda há a vantagem da criopreservação destas células, e de que um doador pode fornecer células a mais de um receptor (Dhawan et al, 2006).

O desenvolvimento de órgãos bioartificiais tem sido recentemente aplicado na IHA, e se baseia num sistema de suporte extra-hepático composto de células e biomateriais, que realiza as atividades de detoxificação e síntese do fígado por um curto período de tempo (Lorenti et al, 2003).

Ambas alternativas descritas possuem como fator limitante a baixa disponibilidade de células, o que tem levado à busca de uma fonte mais acessível de hepatócitos. Baseado nisto, o uso de células-tronco (CT) parece ser uma alternativa promissora na TC para doenças hepáticas.

1.2.1 Células-Tronco

Célula-tronco, por definição, é uma célula capaz de se dividir indefinidamente em cultura e com o potencial de originar células maduras de um tecido especializado (Marshak et al, 2001). Quando uma célula-tronco se divide, ela pode se auto-renovar

(mantendo assim o *pool* de células tronco) ou entrar em uma via de diferenciação que leva à geração de uma célula especializada. Essa forma de divisão assimétrica é um mecanismo fisiológico de manutenção de órgãos e tecidos (Minguell et al, 2001).

Baseado em sua fonte de obtenção e em suas características, as CT podem ser divididas em dois grandes grupos: as células-tronco embrionárias e as células-tronco somáticas (também denominadas adultas).

1.2.1.1 Células-tronco embrionárias

As CT embrionárias são obtidas a partir do blastocisto nos primeiros dias após a fecundação. Elas possuem uma grande capacidade proliferativa e, por definição, são classificadas como células totipotentes, uma vez que podem dar origem a qualquer tipo celular do organismo adulto. A partir do 7º dia de fecundação são chamadas pluripotentes, pois não podem dar origem aos anexos embrionários. Quando implantadas diretamente *in vivo* dão origem a teratomas (tipo de tumor de células germinais constituído de elementos de diferentes tipos de tecido de uma ou mais das três camadas de células germinais), necessitando ser diferenciadas primeiramente *in vitro* (Nussbaum et al, 2007). No Brasil, o uso dessas células é regulamentado pela lei de biosegurança (Lei 11.105 de 24/03/2005). Essa lei permite o uso, para fins de pesquisa e terapia, de CT obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro*, desde que sejam embriões não viáveis ou congelados há mais de 3 anos e com consentimento dos genitores. O uso deste tipo celular têm gerado intensos debates no campo da ética, uma vez que implica a destruição do embrião (Bobbert, 2006).

1.2.1.2 Células-Tronco adultas

As CT adultas possuem diversas origens, podendo ser encontradas no cordão umbilical, na placenta e nos órgãos do indivíduo adulto, onde são responsáveis pelo *turnover* celular dos mesmos. Dessa forma, a partir dessas células, na medula óssea são geradas milhões de novas células do sistema hematopoiético a cada hora. O mesmo se aplica a outros órgãos, permitindo a renovação de células da pele (Alonso and Fuchs, 2003), do intestino (Crosnier et al, 2006), do tendão (Bi et al, 2007) e até mesmo de neurônios (Kornblum, 2007). Nos últimos anos, as células-tronco adultas têm demonstrado grande plasticidade, podendo gerar diversos tipos celulares, quando devidamente estimuladas (Herzog et al, 2003)

As células do cordão umbilical têm sido uma fonte usada para estudos de diferenciação e mesmo em ensaios clínicos utilizando terapia celular. Porém, a criação de bancos de cordão públicos e privados é um tema que vem sendo discutido intensamente entre especialistas no assunto, o governo e a população. Outro ponto que recentemente gerou importantes discussões com relação ao uso dessas células foram estudos que demonstraram que o clampeamento prematuro do cordão para a retirada das CT pode ocasionar depleção do estoque de ferro do neonato (Chaparro et al, 2006).

A fonte de CT adulta mais utilizada em pesquisas e mesmo em ensaios clínicos tem sido a medula óssea. As principais vantagens deste tipo celular são a possibilidade de auto-transplante e a maior oferta quando comparadas ao transplante de órgãos ou de tipos celulares especializados.

Pelo menos duas subpopulações distintas de CT já foram identificadas na medula óssea: as CT hematopoiéticas e as mesenquimais. Esses tipos celulares são caracterizados por possuírem marcadores de membrana próprios e podem ser facilmente distinguíveis em cultivo celular, pois enquanto as CT mesenquimais são aderentes à

placa de cultivo, as hematopoiéticas permanecem no sobrenadante. Ambos tipos celulares demonstraram possuir uma elevada plasticidade, sendo capazes de gerar *in vitro* células de tecidos como o fígado, músculo cardíaco, pâncreas, entre outros (Herzog et al 2003).

A terapia com CT tem sido proposta como alternativa na recuperação do tecido hepático lesionado. Lagasse e colaboradores (2000) comprovaram a capacidade de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea se diferenciarem em hepatócitos *in vivo* e corrigir o dano hepático induzido por um modelo animal de tirosinemia em camundongos. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando as células-tronco mesenquimais da medula óssea, sendo estas capazes de reverter a fibrose no tecido hepático de ratos induzida pela administração crônica do conhecido agente hepatotóxico CCl₄ (Fang et al, 2004). Outros trabalhos utilizaram células totais de medula, ou separadamente as frações mesenquimais e hematopoiéticas, na tentativa de regenerar o tecido submetido a diferentes modelos de hepatopatia crônica, conseguindo bons resultados em modelos animais (Shu et al, 2004; Wu et al, 2005). Em 2004, Jang e colaboradores comprovaram *in vitro* a diferenciação de células tronco hematopoiéticas em hepatócitos após dois dias de co-cultura destas com o fígado de um animal submetido a uma lesão aguda por CCl₄. Neste trabalho foi possível observar expressão de albumina pelas células-tronco após 8 horas de co-cultivo.

Diversos mecanismos de ação têm sido propostos para estas células. No tecido hepático, processos de fusão destas com hepatócitos (Wang et al, 2003; Quintana Bustamante et al, 2006) e diferenciação em células hepáticas (Jang et al, 2004, Lagasse et al, 2000) já foram descritos. Outros estudos propõem que essas células possuam alguma habilidade de iniciar a regeneração hepática através de mecanismos endógenos ainda desconhecidos (Fang et al, 2004).

1.2.2 Células Mononucleares de medula óssea

A fração mononuclear de medula óssea possui, além das células-tronco, outros tipos celulares, como os monócitos, que recentemente demonstraram possuir plasticidade e capacidade de fusão semelhante às células-tronco na recuperação de lesão hepática (Ruhnke et al, 2005; Willenbring et al, 2004). Estudos têm demonstrado que macrófagos também podem contribuir na regressão da doença hepática crônica através da secreção de moléculas que reduzem a fibrose hepática (Higashiyama et al, 2007). Por estes motivos, a fração mononuclear tem sido usada em diversos ensaios clínicos de terapia celular (Lyra et al, 2007) e parece ser uma alternativa promissora para o tratamento dessas doenças.

2. OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos submetidos à lesão hepática aguda por CCl₄ e à lesão hepática crônica através do modelo de ligadura de ducto biliar comum.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

No modelo de lesão hepática aguda:

- Comparar a sobrevivência nos animais tratados e no grupo sham após a lesão hepática aguda.

- Verificar a presença (*engraftment*) das células marcadas transplantadas no fígado dos animais através de microscopia de fluorescência;

- Comparar os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) no grupo tratado e no grupo Sham 24h, 48h e 72h após a lesão;

- Analisar a histologia do tecido hepático 72 horas após o dano com CCl₄, avaliando também o índice de mitoses e apoptoses nos grupos estudados.

No modelo de lesão hepática crônica:

- Analisar as enzimas séricas aspartato e alanina aminotransferases (AST e ALT) e fosfatase alcalina (FA) em ratos submetidos ao modelo de ligadura de ducto biliar antes e 14 dias após o tratamento com células mononucleares de medula óssea.

- Avaliar o tecido hepático dos diferentes grupos, especialmente a deposição de colágeno, através da análise histológica por hematoxilina & eosina e picrossírius.

- Analisar a presença de células transplantadas no fígado e pulmão dos animais tratados através da análise de fluorescência e do PCR do gene SRY.

- Avaliar a oxidação de lipídeos no tecido hepático pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);

Artigos científicos:

Os resultados deste trabalho estão apresentados a seguir sob forma de artigos científicos, abrangendo os objetivos listados anteriormente. O primeiro artigo intitulado “Bone marrow cells improve survival and induce hepatocyte proliferation in rats after CCl₄ acute liver damage” será submetido ao periódico *Life Sciences*. O segundo artigo se intitula “Bone marrow cells reduce collagen deposition in rats with common bile duct ligation” e será submetido ao periódico *Liver International*.

Bone marrow cells improve survival and induce hepatocyte proliferation in rats after
CCl₄-induced acute liver damage

Guilherme Baldo^{1,2}

Roberto Giugliani^{1,2,3}

Maria Cristina Belardinelli^{1,2}

Marcos Eugênio Soares Duarte⁴

Luíse Meurer⁵

Themis Reverbel da Silveira⁶

Ursula Matte^{1,6}

1. Gene Therapy Center- Research Center- Hospital de Clínicas de Porto Alegre- RS-Brazil
2. Post-Graduation Program in Biochemistry- Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre- RS-Brazil
3. Medical Genetics Service- Hospital de Clínicas de Porto Alegre- RS- Brazil
4. Experimental Animal Unit- Research Center- Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS-Brazil
5. Pathology Service- Hospital de Clínicas de Porto Alegre- RS- Brazil
6. Experimental Hepatology Laboratory- Research Center- Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS-Brazil

Correspondence author:

Guilherme Baldo
Gene Therapy Center
Research Center-HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre-RS-Brazil

CEP:90035-903

Fone/Fax: 55-51-21018010

E-mail: guibaldo@ig.com.br

ABSTRACT

Acute liver failure (ALF) leads to a rapid and progressive destruction of hepatocytes with metabolic consequences, and the only current treatment available is orthotopic liver transplantation. Stem-cell based therapies have recently emerged as a new therapeutic option for liver diseases. In this work we evaluated the effect of bone marrow mononuclear cell transplantation in rats with acute liver damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄).

Methodology: Cells from male Wistar rats were obtained using Ficoll density gradient, and 0.2mL of 5×10^6 cels/mL were injected into the portal vein of female Wistar rats (n=15) 24h after CCl₄ induced liver damage. Sham group (n=15) was performed injecting only vehicle with no cells in CCl₄ damaged animals. Survival, liver histology, mitosis and apoptosis number and identification of DAPI stained donor cells were observed 72h after CCl₄ damage. ALT levels were measured at 0h, 24h, 48h and 72h after injury.

Results: Fluorescent stained cells could be visualized in livers of recipient rats at the time of sacrifice. Bone marrow treated group revealed a significant improvement in survival rate after 72 hours (p =0.003). Besides, we found a significant increase in the mitotic index in livers from treated animals (p= 0.029) suggesting a possible new mechanism for stem cells in liver disease. ALT levels were reduced in the treated group after 72h (p=0.034). Liver histology was similar in the surviving animals from both groups.

Conclusion: Our results indicate that bone marrow cell transplantation has potential as a new therapeutic option for acute liver disease.

Key words: bone marrow stem cells; acute liver failure; carbon tetrachloride; cell therapy.

INTRODUCTION

Pronounced hepatic damage may lead to an acute liver failure (ALF), a syndrome characterized by rapid deterioration of liver function and high mortality. Loss of liver functions causes several life-threatening complications, leading to multiple organ failure (Onodera et al., 2006). The only established treatment is orthotopic liver transplantation (OLT), however, because of the organ shortage, a significant percentage of patients die while waiting for transplant (Sass and Shakil, 2005). It is important to stress that liver failure is potentially reversible due to the liver's regenerative capacity. Thus, cell-based therapies have emerged as an alternative to OLT (Nussler et al., 2006) in order to maintain or reestablish liver function after failure. Cell transplantation offers advantages, being a less-invasive procedure when compared to whole organ transplantation and can be performed repeatedly if necessary.

Hepatocyte transplantation has been used for treatment of metabolic diseases (Sokal et al., 2006) and to decrease mortality in cases of acute liver failure (Fox et al., 1998). Still, one of the major problems concerning hepatocyte transplantation is the limited supply of these cells. Regarding this fact, new strategies based on stem-cell therapies have been developed during recent years. These cells may present a good alternative to OLT in ALF and for correction of liver-based genetic disorders which lead to metabolically deficient states (Nussler et al., 2006).

In this work we evaluated the effects of bone marrow mononuclear cell (BMC) transplantation in CCl₄ treated Wistar rats, and verified a rapid engraftment of the cells in liver parenchyma, increasing the survival of the treated animals and reducing ALT levels. Besides, we verified that these cells produced a significant increase in the

number of mitosis in hepatocytes, thus providing a possible new mechanism for liver regeneration induced by bone marrow cells.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used 59 female Wistar rats weighting 200 - 240g to perform the experiments. Male rats of the same weight were used as cell donors. All animals were obtained from Laboratory of Animal Reproduction and Experimental Center, (CREAL - ICBS /UFRGS). Animals were kept at Experimental Animal Unit of Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), under controlled temperature (between 18 and 22°C) in light-dark cycles of 12 hours. Standard rat chow and water were given ad libitum.

Experimental design

In order to access all the experimental conditions, rats were divided into two main subsets. Subset Sham: rats (n=15) were given 1.25 mL/kg of CCl₄ orally (Wong et al., 2000) and 24h later received 0.2mL of PBS solution via portal vein. Subset BMC: rats (n=15) received the same dose of CCl₄ and 24h later were injected with 0.2mL of bone marrow cells in phosphate buffer saline (PBS) suspension. In addition, we performed a group in which rats received just BMC via portal vein (n=4) with no hepatic damage. In these groups, all surviving animals were sacrificed 72h after CCl₄ damage induction.

Fifteen animals (n=5 each time) were sacrificed at different time points (24h, 36h and 48h) to obtain data about kinetics of CCl₄ damage. A group of 10 animals was maintained up to 72h after CCl₄ administration for evaluation of mortality rate in this animal model.

Acute Liver Injury Model

Female Wistar rats were weighted just before the CCl₄ administration. The 1.25 mL/kg dosis of CCl₄ was then diluted in olive oil, reaching a final volume of 1 mL. The solution was administered through gavage as a single dose (Wong et al, 2000).

Isolation and staining of BMC

Male Wistar rats were used as donors in a proportion of 1 donor to five recipients. The femurs and tibias were isolated and whole bone marrow from each bone was flushed with 3mL DMEM (Gibco) into a 15mL tube, in a sterile environment. These cells were then placed onto a Ficoll Histopaque layer and centrifuged at 800 xg for 30 minutes. The interface was separated using a pipette, and cells were rinsed with 10 mL PBS three times. Cells were counted using Neubauer chamber and Trypan Blue exclusion test to verify cell viability. DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole 2.7 mg/mL (Roche)] fluorescent staining was performed according to manufacturer's protocol. Again, cells were rinsed with PBS, counted using trypan blue exclusion test in a Neubauer chamber, and adjusted to a final concentration of 5×10^6 cels/mL in 0.2 mL of PBS. The whole procedure took about 2 hours (from isolation to transplantation), during which cells were kept at room temperature.

Cell Characterization

An aliquot containing 4×10^5 cells from the mononuclear fraction obtained was cytocentrifuged, stained with May-Grünwald/Giemsa for 2 minutes and analyzed under optic microscopy for cell characterization.

Cell Transplantation

Animals were anesthetized with 100 mg/kg of Ketamine (Eurofarma Lab) 10% and 10mg/kg of Xylazine (Sespo) 2% intraperitoneally just before surgery. A 3 cm longitudinal incision was performed in the abdomen, the portal vein was exposed and 0.2 mL of the cell suspension was injected in bolus. To avoid bleeding, porcine collagen matrix (Cuntanplast) was placed over the vein. Animals were sutured in layers with polyglactin 4-0 (Vicryl Ethicon) and Monofilament 4-0 (Monocryl Ethicon) and allowed to recover in the cage. Sham group was submitted to the same surgical procedure, although receiving 0.2 mL of vehicle with no cells.

Biochemistry

Blood was collected at time points 0, 24, 48 and 72 hours after CCl₄ administration through retrorbital puncture under anesthesia. Alanine aminotransferase (ALT) was measured using the enzyme kinetics method (Henry et al, 1960). Only animals with ALT levels ≥ 3 fold the normal reference values 24 hours after CCl₄ administration were included in the study.

Histologic evaluation

Rats who survived up to 72 hours after CCl₄ administration were sacrificed in CO₂ chambers. At the time of death, three lobes from liver, whole lung and spleen were collected and placed in 10% buffered formalin solution for 24 hours, and submitted to routine histology processing. Hematoxylin and eosin (H-E) staining sections were analyzed under optic microscopy by a trained pathologist, blind to the treatment groups. Necrosis was evaluated by counting the rows of necrotic hepatocytes from the perivenular zone (acinar zone 3). Bridging necrosis and hydropic degeneration were noted when present. Steatosis was graded as absent, mild, moderate and severe. The mitotic and apoptotic indexes were counted in 10 high power fields (400X magnification). Presence of inflammatory infiltrate was classified as present or absent. To analyze the presence of DAPI positive (fluorescent) cells, at least six unstained sections per organ were visualized under a fluorescence microscope (Olympus BH Series) using the appropriate filter set. Sections from lungs and spleen were also analyzed by H-E staining and for the presence of fluorescent cells.

Data analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*). Comparison between Sham and BMC groups for mitotic index was done by two tailed Student's t test for independent samples and results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). ALT levels and apoptotic index were evaluated by Mann-Whitney test and presented as median and interquartil range (IQR 25 and IQR 75). Survival was

evaluated using Long Rank (Mantel Cox) test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Ethics and Hazard issues

The study was approved by local ethics committee and all participants received adequate training concerning hazardous issues and animal handling.

RESULTS

Animal model

Prior to the study, 15 animals were euthanized at different time points after CCl_4 injury (24h, 36h and 48h). Kinetics of hepatic damage was then evaluated based on liver histology and ALT levels. At the first time point analyzed (24h) an intense necrosis was observed in liver parenchyma and the peak of ALT was identified (mean of 392.6 ± 89.4 U/mL). In addition, the animals seemed to be lethargic after CCl_4 induction, suggesting that, in some degree, encephalopathy was also present.

The histologic pattern persisted with minor changes after 36h and ALT showed a small decrease (mean of 327.0 ± 173.4 U/mL). At 48h after CCl_4 damage micro and macrovesicular steatosis increased, and necrosis diminished, as well as ALT levels (117.2 ± 70.4 U/mL). Ten rats were observed up to 72h and the survival rate was 70%. ALT levels were markedly reduced (95.6 ± 69.1 U/mL) when compared to 24h, although still not reaching normal levels. Liver histology did not present any signs of necrosis, but still some steatosis was present.

Cell Characterization

Differential counting revealed that most cells (60%) were lymphocytes, 15% were characterized as monocytes, 17% as granulocytes and 8% as erythroblasts. Cells presenting blue cytoplasm and nucleoli could be visualized, suggesting that they were immature cells.

Survival analysis

Using the experimental design explained above, we then compared a subset of BMC treated animals with a subset of sham-operated animals. Survival rate was considered the primary end point.

At the time of sacrifice sham group presented a mortality of 47%. None of the bone marrow treated rats died during the experiment (100% survival), showing a marked increase in the survival rate (figure 1) when compared to Sham group ($p=0.003$). Rats that received only cells and no CCl_4 damage also had a 100% survival.

Biochemistry

As expected, ALT levels reached values 5 times higher than normal 24 hours after injury in both groups, and diminished with time (Table 1). ALT levels were statistically reduced in BMC group ($p= 0.034$) reaching normal values after 72h. The group that received only bone marrow cells and no CCl_4 showed no changes in ALT levels, indicating that bone marrow cell injection per se did not cause any significant damage to the liver (data not shown).

Histologic evaluation

We were not able to observe any difference in animals that survived for 72h, since both groups seemed to be completing the liver regenerative process. However, animals from Sham group that died before 72h had an intense and bridging necrosis, presenting also micro and macrovesicular steatosis and hydropic degeneration (Figure 4-D). Animals from both groups that survived for 72h revealed the presence of inflammatory infiltrate and macrophages reabsorbing the necrotic cells. Necrosis was reduced to almost null levels, but mild levels of steatosis and hydropic degeneration were still present (Figure 4-B and 4-C).

Mitotic and apoptotic indexes

Mitotic and apoptotic indexes were calculated considering 10 high power fields (400X magnification). The number of mitosis (Figure 2-A) in bone marrow treated group was approximately twice as high as in Sham group ($p= 0.029$). When analyzed in the fluorescence microscope, cells seen in mitosis were not stained blue with DAPI, suggesting that they were not donor-derived cells, but receptor's hepatocytes in proliferation. The apoptotic index was not different between the groups [median of 2.0 (0.0 to 3.0) for sham and 2.0 (1.0 to 3.0) for BMC].

Fluorescence analysis

DAPI positive cells could be visualized in livers from bone marrow treated group. Cells were detected mostly as single cells placed around both portal and centrilobular tracts. Very rare aggregates of few cells were visualized. A visual analysis revealed that most cells were near or within sinusoids, thus not consistent with features of hepatocytes (Figure 3-A). A few cells, however, adopted a hepatocyte-like phenotype (Figure 4-B), showing a big rounded nuclei in the parenchyma. These results indicate rapid

engraftment of these cells into the recipient liver. No fluorescent cells were visualized in the lungs or spleens.

DISCUSSION

In this study we verified the effects of BMC transplantation in rats with CCl₄-induced ALF. The first point we had to consider was to evaluate the kinetics of CCl₄ liver damage. The sacrifice of animals at different time points after liver injury was important to decide the time of cell injection, since if cells were injected too soon there would be still some CCl₄ toxicity in the tissue that could kill the fresh cell population. On the other hand, if the injection was performed too late, the cells would not have enough time to play their role. It also allowed us to determine the best time to evaluate liver regeneration and histological differences between the groups. Based on this, we decided to evaluate the role of bone marrow cells injected 24h after CCl₄ administration with a follow up of 72h of liver injury.

We were able to demonstrate a marked increase in the survival rate of BMC treated animals, which could, in the near future, have important clinical applications. Other groups have also demonstrated an improvement in survival in animals with ALF using other types of cell therapies, such as blood cord stem cells (Di Campli et al., 2005) or even hepatocytes derived from stem cell differentiation processes (Jang et al., 2004).

The benefits of using BMC as a source of cells for treating ALF are based mostly on their availability. Although blood cord stem cells were successfully used as a rescue therapy for acute liver damage in ALF animal models (Di Campli et al., 2004), ethical questions concerning their use were recently raised, since early cell extraction may implicate in a loss of the infants' iron stores (Mercer et al., 2006). The feasibility of autotransplantation is also difficult, even with the existence of blood cord banks, as the

efficacy of these long-lasting cryopreserved cells still needs to be evaluated (Berz et al., 2007).

The use of mononuclear bone marrow cells as proposed in this study may offer other advantages when compared to stem cell purified populations. BMC contains both hematopoietic and mesenchymal stem cells, which are able to differentiate into hepatocytes (Lagasse et al., 2000; Kang et al, 2005). Recently the ability of monocytes (Ruhnke et al., 2005) and other cell types (Lysy et al., 2007) to differentiate into hepatocytes was also demonstrated, overcoming epigenetic mechanisms of gene expression control. Analyzing this context, mononuclear bone marrow stem cells seem to be a more adequate source of stem cells for acute liver damage. The main advantages of these cells are the possibility of autotransplant and the rapid process involved in cell obtention. This last aspect is critical in the case of acute liver damage, since liver failure may occur within days, needing a rapid intervention. Cell replacement must be done as fast as possible and cell differentiation protocols usually take at least 2-3 weeks. An evidence of the feasibility for using bone marrow cells in ALF was the work of Gasbarrini et al. (2007). In this first clinical use of bone marrow stem cell transplantation, the patient showed a rapid improvement in liver function but died 50 days after the procedure due to a bacterial infection.

Even though bone marrow stem cells are already used in clinical trials for many diseases, the actual mechanisms through which they improve organ regeneration are not completely understood. In our study, the increase in mitotic index observed in BMC group may provide a new mechanism for stem cell-based organ regeneration. Our hypothesis is that the transplanted cells engraft into liver (which could be observed by DAPI staining) and secrete mitotic cytokines in response to a specific damage. Other groups have recently proposed a similar paracrine effect from either whole mononuclear

bone marrow cells in the reconstitution of injured myocardium (de Macedo Braga et al., 2007), or purified mesenchymal stem cells in chronic liver damage (Fang et al., 2004). However, both groups did not establish any correlation with cell proliferation but directly with regenerative process. It is worth noticing that in undamaged animals injected with BMC we did not verify any sign of hepatocyte proliferation, suggesting that this mechanism is injury-dependent. Microarray analysis of gene expression after stem cell therapy for acute liver injury showed an up-regulation of genes involved in cell proliferation (Piscaglia et al., 2005). The increase in the mitotic rate of hepatocytes observed in our study might be a cellular response to this stem cell-mediated up-regulation. It may also explain the differences in ALT levels observed at 72h, reflecting a faster recovery of liver function.

It is important to emphasize that our findings do not exclude other mechanisms for liver repair induced by stem cells. Controversial studies demonstrated that differentiation is the main process underlying stem cell ability of regenerating tissues (Shi et al., 2005), however fusion, direct and indirect transdifferentiation have also been proposed (Herzog et al., 2003). Whether differentiation of stem cells into hepatocytes occurs or not in this animal model we cannot confirm precisely. We were able to visualize fluorescent cells with hepatocyte phenotype, suggesting that differentiation or fusion processes may occur. It is likely that those listed mechanisms may occur simultaneously during the regenerative process.

As far as we know, this is the first pre-clinical study using mononuclear bone marrow cells for ALF. The findings of our work indicate that bone marrow mononuclear cell transplantation may represent a good therapeutic alternative for treatment of ALF in drug induced poisoning. However, adequate clinical trials should be performed in other animal models and then in humans to verify the effects of

transplantation of these cells. Bone marrow derived stem cells have yet to be clinically implemented for acute liver damage conditions, but BMC are relatively accessible, which make them an appealing alternative.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank FIPE-HCPA, CNPq and CAPES for financial support.

REFERENCES:

Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J hematol* 2007 Jun;82(6):463-72.

Chaparro CM, Neufeld LM, Tena Alavez G, Eguia-Líz Cedillo R, Dewey KG. Effect of timing of umbilical cord clamping on iron status in Mexican infants: a randomised controlled trial. *The Lancet*, Volume 367, Issue 9527, Pages 1997-2004

de Macedo Braga LM, Rosa K, Rodrigues B, Malfitano C, Camassola M, Chagastelles P, Lacchini S, Fiorino P, De Angelis K, D'Agord Schaan B, Irigoyen MC, Beyer Nardi N. Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Oct 31; [Epub ahead of print]

Di Campi C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis*. 2004 Sep;36(9):603-13

Di Campli C, Piscaglia AC, Rutella S, Bonanno G, Vecchio FM, Zocco MA, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Improvement of mortality rate and decrease in histologic hepatic injury after human cord blood stem cell infusion in a murine model of hepatotoxicity. *Transplant Proc.* 2005;37(6):2707-10

Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation.* 2004 Jul 15;78(1):83-8

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1998 May 14;338(20):1422-6.

Gasbarrini A, Rapaccini GL, Rutella S, Zocco MA, Titotto P, Leone G, Pola P, Gasbarrini G, Di Campli C. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis* 2007; 39; 878-882

Henry RJ, Chiamori N, Golub O, Berkman S. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *Amer J Clin Path* 1960; 34: 381-98.

Herzog EL, Chai L and Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-93

Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol.* 2004 Jun;6(6):532-9

Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol.* 2005 Jun 14;11(22):3479-84

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1229-34.

Lee WS, McKiernan P and Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood fulminant hepatic failure in the United kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005; 40(5):575-81

Lysy PA, Smets F, Sibille C, Najimi M, Sokal EM. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation.. *Hepatology.* 2007 Nov;46(5):1574-85

Mercer J, Erickson-Owens D. Delayed cord clamping increases infants' iron stores. *Lancet.* 2006 Jun 17;367(9527):1956-8.

Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol.* 2006 Jul;45(1):144-59

Onodera K, Sakata H, Yonekawa M, Kawamura A. Artificial liver support in present and the future. *J Artif Organs* 2006; 9: 17-28.

Piscaglia AC, Zocco MA, Di Campli C, Sparano L, Rutella S, Monego G, Bonanno G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. How does human stem cell therapy influence gene expression after liver injury? Microarray evaluation on a rat model. *Dig Liver Dis.* 2005; 37(12):952-63.

Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F. Differentiation of In Vitro-Modified Human Peripheral Blood Monocytes Into Hepatocyte-like and Pancreatic Islet-like Cells. *Gastroenterology.* 2005 Jun;128(7):1774-86

Sass DA and Shakil AO. Fulminant hepatic failure. *Liver Transpl* 2005;11(6):594-605.

Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res.* 2005;31(4):223-31

Sokal EM. Liver transplantation for inborn errors of liver metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2006 Apr-Jun;29(2-3):426-30.

Wong CK, Ooi VEC and Ang PO. Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere* 2000; 41; 173-176.

Table 1: ALT levels (U/mL) after liver damage induced by CCl₄ in sham and bone marrow cells (BMC) groups. Results are expressed as median and interquartil range (IQR 25 and IQR 75).

	0h	24h	48h	72h
BMC	42.0 (32.0 to 49.0) n=15	195.0 (143.0 to 1098.0) n=15	115 (90 to 232.0) n=15	52 (48.0 to 70.0)* n=15
Sham	36.5 (31.3 to 42.0) n= 15	265 (131.5 to 520.3) n=15	177.5 (81.3 to 586.3) n=9	91 (56.3 to 146.3) n=8

*p = 0.034 – Compared to Sham group using Mann-Whitney test.

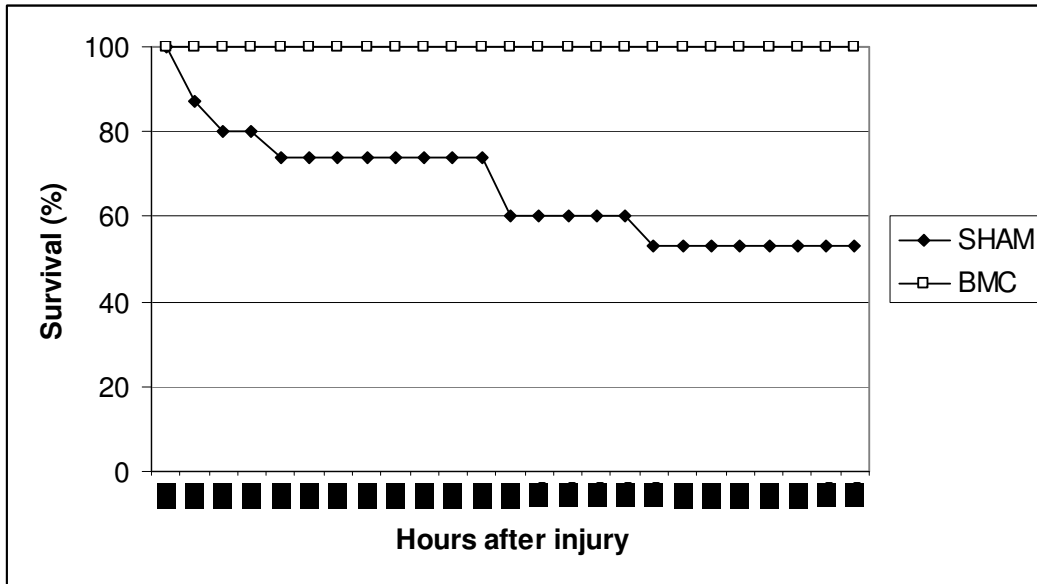


Figure 1: Kaplan-Meier curve showing the survival rate from sham and bone marrow treated animals up to 72 hours after CCl₄ administration. The survival in the bone marrow treated group was statistically different when compared to sham ($p = 0.003$) using Chi-Square test.

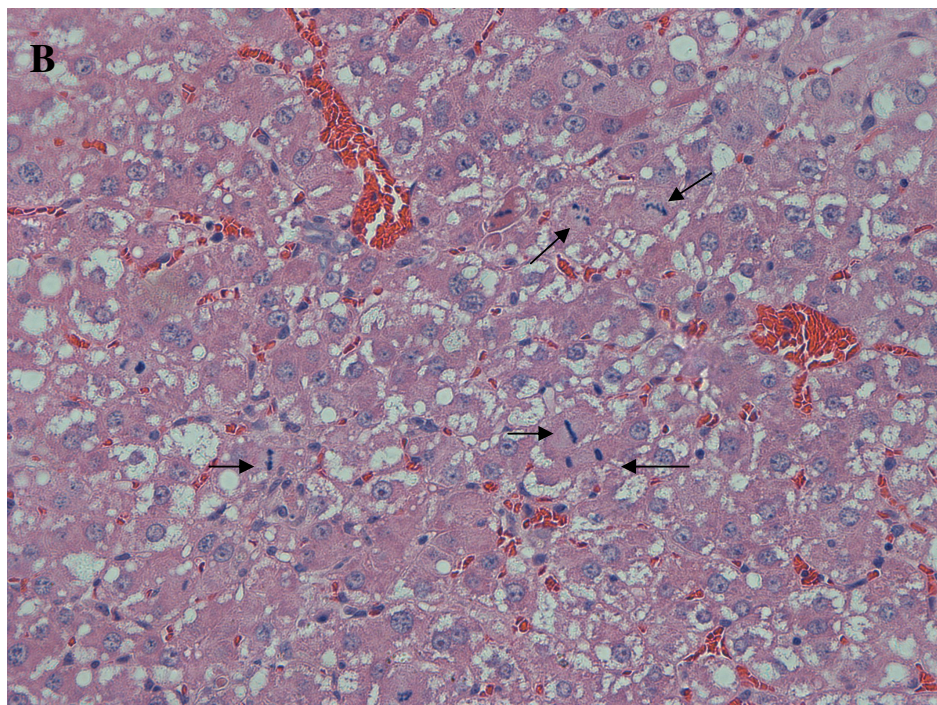
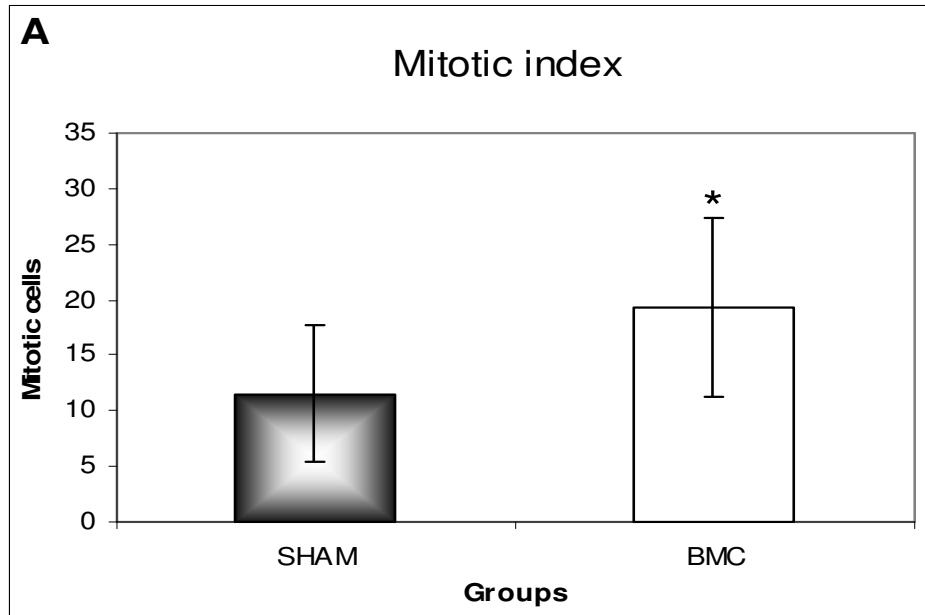


Figure 2: Mitotic activity in sham and bone marrow treated rats 72 hours after CCl_4 administration. A) mitotic index counted in 10 high power fields, expressed as mean \pm S.D. * $p = 0.029$ compared to Sham Group, Student's t test. B) H-E staining of a representative liver section of bone marrow treated animal. Arrows indicates mitotic cells (400X magnification).

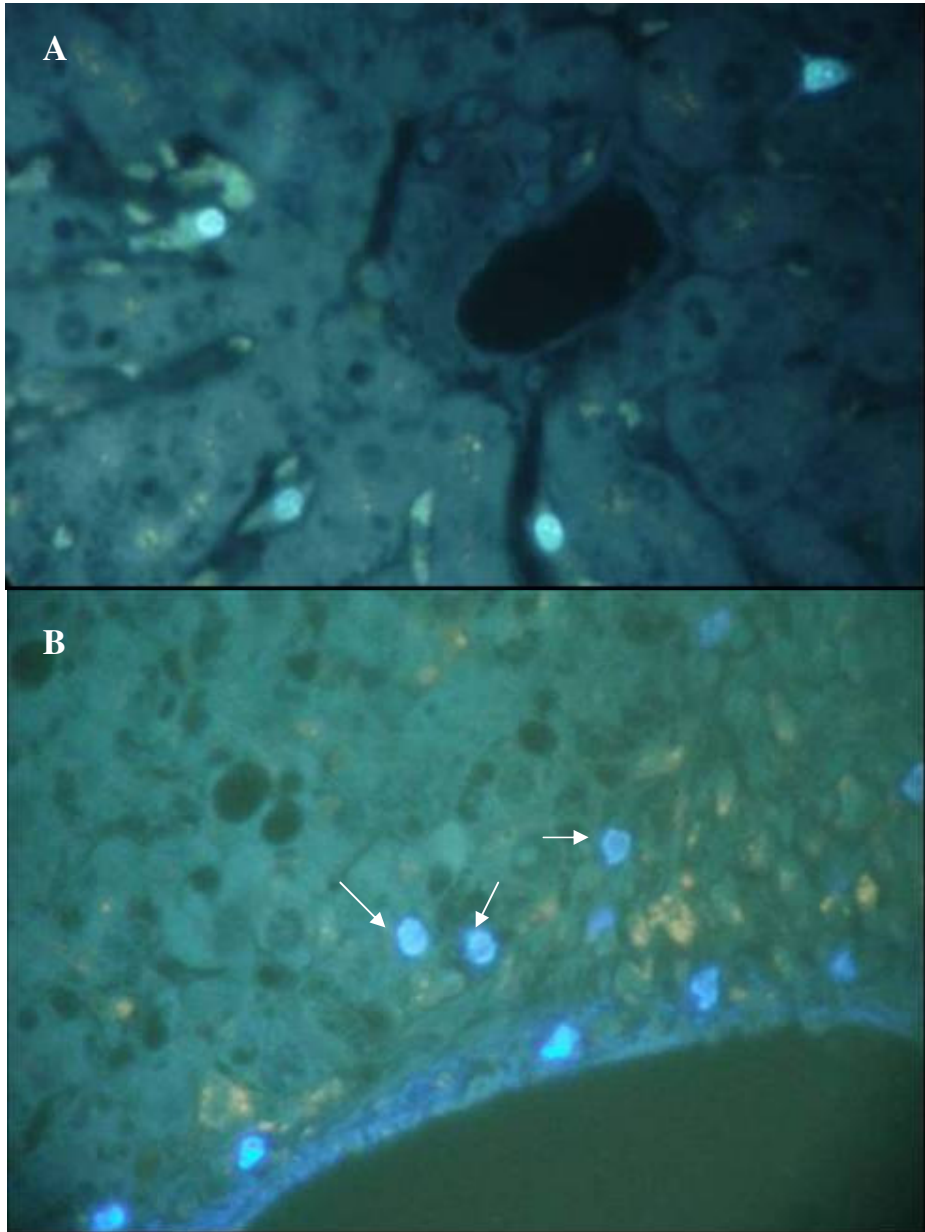


Figure 3: Unstained liver sections of bone marrow treated animals analyzed under fluorescence microscopy revealing fluorescent engrafted cells with A) undefined phenotype and B) hepatocyte-like phenotype (arrows). Magnification 2000X.

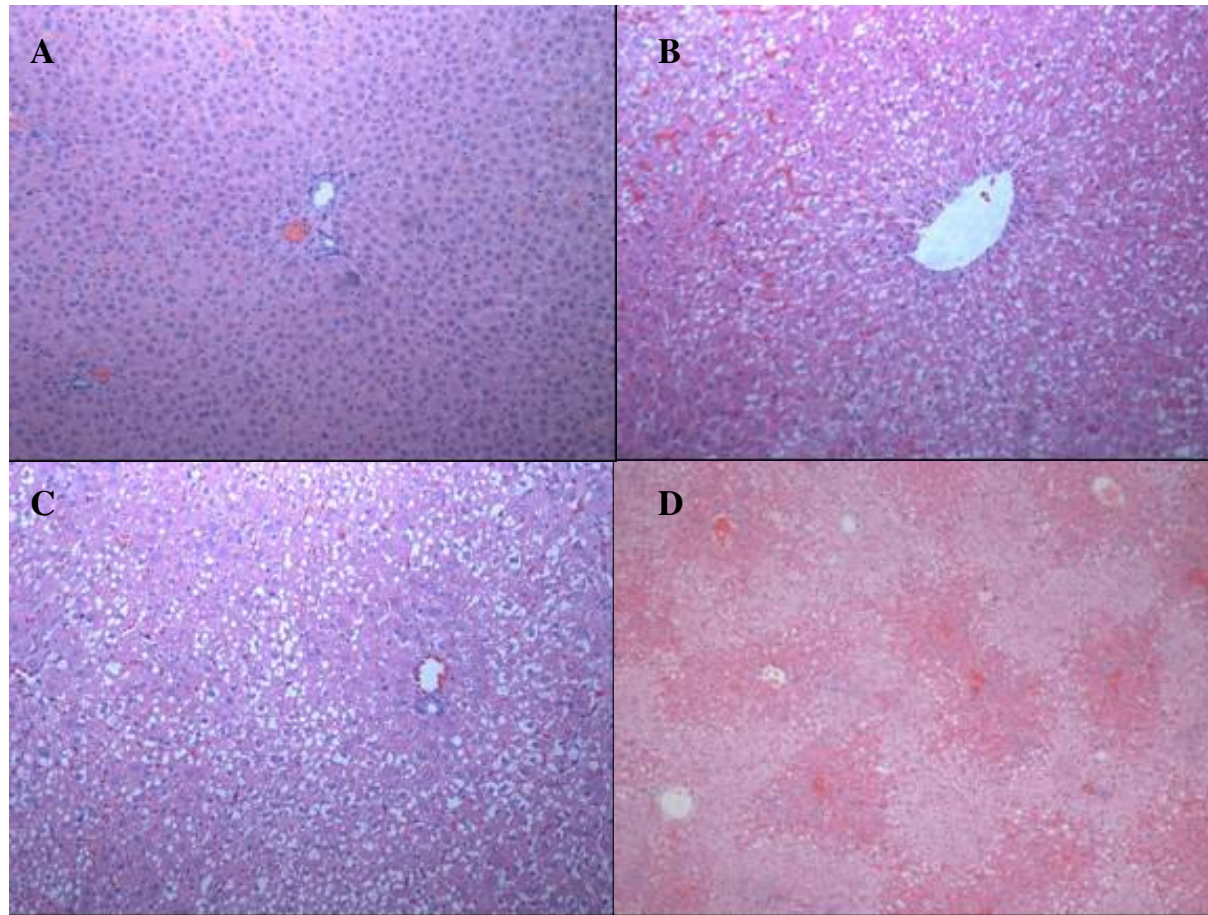


Figure 4: H&E liver sections from: A) Undamaged liver. B) BMC group, 72h after injury. C) Sham group, 72h after injury. D) Sham rat dead 48h after injury, showing intense bridging necrosis. Magnification 200X

BONE MARROW CELLS REDUCE COLLAGEN DEPOSITION IN RATS WITH COMMON BILE DUCT LIGATION

Guilherme Baldo^{1,2}

Nelson Alexandre Kretzmann^{3,5}

Juliana Tieppo³

Gustavo Pereira Filho³

Carolina Uribe¹

Luise Meurer⁴

Themis Reverbel da Silveira³

Cláudio Augusto Marroni⁵

Norma Possa Marroni³

Roberto Giugliani^{1,2}

Ursula da Silveira Matte^{1,3}

1. Gene Therapy Center- Research Center- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
2. Post Graduation Program in Biochemistry- Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
3. Laboratory of Experimental Hepatology and Phisiology - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Pathology Service- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
5. Universidade Federal de Ciências da Saúde – Porto Alegre
6. Post Graduation Program in Genetics: Universidade Federal do Rio Grande Do Sul

Key words: common bile duct ligation; bone marrow cells; cholestasis; liver fibrosis;

Running title: Cell therapy in bile duct ligated rats

Correspondence author:

Guilherme Baldo

Gene Therapy Center

Research Center-HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre-RS-Brazil

CEP:90035-903

Fone/Fax: 55-51-21018010

E-mail: guibaldo@ig.com.br

ABSTRACT

Background: Although some groups have shown good results using bone marrow cells to ameliorate liver fibrosis, controversy remains about their pro-fibrogenic potential.

Aims: In this work we evaluated the effects of mononuclear bone marrow cell transplantation upon biochemical and histological parameters of rats submitted to common bile duct ligation.

Methods: We analyzed liver histology using H-E and Sirius red staining. Engraftment of donor cells was visualized using fluorescent staining and PCR for Y chromosome detection. In addition, we analyzed lipid peroxidation and biochemical parameters, namely alanine and aspartate aminotransferases and alkaline phosphatase.

Results: Collagen deposition was reduced in the hepatic tissue of treated animals. We were able to visualize fluorescent cells in livers and lungs of treated animals. Y chromosome PCR in recipient animals confirmed the presence of donor cells in both organs. Lipid peroxidation was not different between groups.

Conclusion: Our results indicate that cell transplantation may be useful for treating chronic liver disease. However, more studies are still needed to obtain data about mechanisms of cell action.

Key Words: bone marrow cells; cell therapy; common bile duct ligation; liver fibrosis; chronic liver disease.

INTRODUCTION

Liver fibrosis and its end stage, cirrhosis, represent a serious worldwide health care problem. It may be caused by genetic disorders (1), viruses (2), toxins (3), and cholestatic diseases (4). Liver transplantation is a highly successful treatment for end-stage cirrhosis, with a 75% 5-year survival rate (5). However, limited availability of organs and comorbid factors are still major problems.

In the last years, several groups have demonstrated the ability of bone marrow cells (BMC) to regenerate liver fibrosis, through mechanisms not fully understood (6). On the other hand, other groups have shown a pro-fibrogenic ability of bone marrow derived cells (7).

In this work we evaluated the effects of mononuclear bone marrow cell transplantation upon biochemical and histological parameters of rats submitted to common bile duct ligation (BDL). Collagen deposition was reduced in the hepatic tissue. We were able to visualize fluorescent cells in livers and lungs of treated animals. Y chromosome PCR in recipient animals confirmed the presence of donor cells in both organs. On the other hand lipid peroxidation was not different between groups.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used 23 female Wistar rats weighting 200 – 240 g to perform the experiments. Male rats of the same weight were used as cell donors. All animals were obtained from Laboratory of Animal Reproduction and Experimental Center, (CREAL - ICBS /UFRGS).

Animals were kept at Experimental Animal Unit of Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (UEA-HCPA), under controlled temperature (between 18 and 22°C) in light-dark cycles of 12 hours. Standard rat chow and water were given *ad libitum*. The study was approved by the local ethics committee.

Experimental design

In order to access all the experimental conditions, rats were divided into three groups. Bone marrow cells (BMC) group: rats (n=6) were submitted to common bile duct ligation surgery and two weeks later were injected with 0.2 mL of bone marrow mononuclear cells in phosphate buffer saline (PBS) suspension. PBS group: rats (n=5) were submitted to the same surgical procedure of bone marrow cells group, but received only 0.2 mL of PBS with no cells. Sham group: rats (n=5) were submitted to the same surgical procedure of the two first groups, but the bile duct was not ligated or transected and 0.2mL of PBS were injected. All animals were sacrificed four weeks after the first surgery.

Animal surgery

Rats underwent BDL at 12 weeks of age, for a 4-week period before sacrifice. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine 100mg/kg (Eurofarma Lab-Brazil) 10% and 10mg/kg of Xylazine (Sespo, Brazil) 2% intraperitoneally. After performing a 3 cm incision in the abdomen, the common bile duct was ligated two times with 4-0 silk (Ethicon, Brazil) and transected on both ends. Sham operation was performed similarly except that the bile duct was not ligated or transected.

Isolation and staining of BMC

Male wistar rats were sacrificed in CO₂ chambers. The femurs and tibias were isolated and whole bone marrow from each bone was flushed with 3mL DMEM (Gibco, USA) into a 15mL tube, in a sterile environment. These cells were then placed onto a Ficoll Histopaque (GE-Healthcare, USA) layer and centrifuged at 800 x g for 30 minutes. The interface was separated using a pipette, and cells were rinsed with 10 mL PBS three times. Cells were counted using Neubauer chamber and trypan blue exclusion test to verify cell viability. DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole 2.7 mg/mL (Roche, Germany)] fluorescent staining was performed according to manufacturer's protocol. Again, cells were rinsed with PBS, counted using trypan blue exclusion test in a Neubauer chamber, and adjusted to a final concentration of 5×10^6 cels/mL in PBS.

Cell Transplantation

Animals were anesthetized with 100mg/kg of Ketamine 10% and 10mg/kg of Xylazine 2% intraperitoneally just before transplant. A 3 cm longitudinal incision was performed in the abdomen, the mesenteric vein was exposed and 0.2 mL of the cell suspension was injected *in bolus*. To avoid bleeding a porcine collagen matrix (Mascia Brunelli, Italy) was placed over the vein. Animals were sutured in layers with polyglactin 4-0 (Ethicon, Brazil) and Monofilament 4-0 (Ethicon, Brazil) and allowed to recover in the cage. PBS group was submitted to the same surgical procedure, although receiving 0.2 mL of vehicle with no

cells. A small liver biopsy was collected and processed for histological analysis at the time of cell injection.

Histological analysis

At the time of sacrifice liver and lung specimens were flash frozen in liquid nitrogen for DNA extraction and lipid peroxidation evaluation or fixed in 10% formalin solution before embedment in paraffin wax for histological analysis. Hematoxylin-eosin as well as Sirius red staining were performed on all specimens 2 and 4 weeks after BDL surgery.

Liver histological analysis was performed by a pathologist blind to the treatment groups. Bile duct proliferation was graded as null, mild, moderate or intense. Inflammatory infiltrate was classified as present or absent.

Apoptotic and mitotic indexes were quantified in H-E sections by counting the number of positive cells in 10 high power fields (400X magnification). Cells were identified as mitotic and apoptotic located in parenchyma or in the bile duct proliferation areas.

To histologically quantify collagen deposition, we used a computerized image analysis system. Images were captured using a microscope-mounted digital camera and stored digitally on a computer. Adobe Photoshop CS3 was used to calculate the percent area stained positively in Sirius Red sections, evaluating 10 high-power fields (400X) of each animal, using technique adapted from Mencin et al (8). The positive red staining was quantified as number of pixels, and divided by the total pixels from each picture. Results were expressed as percentage of red stained area.

Biochemistry

Serum was collected for measurement of hepatic enzymes at 2 (through retroorbital puncture) and 4 weeks (through portal puncture) after BDL. Measurement of alanine aminotransferase (ALT) aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (AP) were performed spectrophotometrically and results were expressed as U/mL.

Lipid peroxidation assay

Liver lipid peroxidation was determined by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified using 3 mg of protein per sample. The tissue homogenates were incubated at 90°C for 30 min after adding 500 µL of 0.67% thiobarbituric acid in 10% trichloroacetic acid, then centrifuged at 4°C at 2000 x g for 15 minutes. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535nm (9). Results were expressed as nmol/ mg protein.

Y chromosome detection

PCR for SRY gene was performed in rat lungs and livers, using GAPDH as internal control. Total DNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, USA). DNA was quantified and 100 ng were used as template. The SRY gene was amplified using 20 pmol of each primer (SRY forward 5'-AAGCGCCCCATGAATGCATT-3' and SRY reverse 5'-CAGCTGCTTGCTGATCTCTG-3', 5 µL of buffer (75mM Tris-HCl- pH 9.0; 2mM MgCl₂; 50mM KCl, 20 mM, 107 (NH₄)₂SO₄; 0.001% BSA); 0,2mM dNTP; 1.5mM of MgCl₂ and

3U of Taq polymerase. Reagents were used in the same quantities for GAPDH amplification, but primers used were 5'-GGACACTGAAGTTGTCGTTGAG-3' and 5'-CAGCAATGCATCCTGCAC-3'. SRY amplification was performed with annealing at 62°C, and GAPDH at 52°C. Both protocols were performed using 32 PCR cycles. Amplification lengths were 102 bp for SRY and 429 bp for GAPDH. PCR products were visualized in 1.6% agarose gel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 14.0. Biochemical findings were analyzed by Oneway ANOVA and Duncan's test at 14 and 28 days after surgery to observe changes due to the experimental model. TBA-RS evaluation at 28 days was also evaluated using this test.

ANOVA for repeated measures and Duncan's test was performed to detect changes among the groups, time and interaction. Student's t test for paired samples was performed to detect biochemical changes between 14 and 28 days within each group. A $p < 0.05$ was considered statistically significant

RESULTS

Animal model

Rats who underwent BDL presented jaundice features, as yellow ears and tail. Seven animals (30%) died before 14 days, four of them presented ascites. Portal hypertension was

evident by dilatation of the splenic veins. It was not observed differences among the groups on animal weight (data not shown). Sham rats presented none of these features during the experiments.

Histological analysis

Two weeks after BDL, rats presented moderate levels of bile duct proliferation, with mild fibrosis associated to injury areas and inflammatory infiltrate. Fibrotic area was similar in PBS and BMC rats (figures 1C and 1E), but higher than in sham group ($p < 0.05$).

Percentage of collagen area was evaluated in livers from sham, PBS and BMC groups after 14 and 28 days of bile duct ligation. Collagen deposition quantified by Sirius red staining revealed that BMC treated rats presented levels barely increased 2 weeks after cell injection. On the other hand, collagen levels in PBS group at 28 days presented values almost twice as high as they did in 14 days (figure 2). This reduction in fibrotic area was statistically significant ($p < 0.01$).

An increase in bile duct proliferation could be observed in both groups (PBS and BMC) four weeks after BDL (figures 1D and 1F). Both groups presented inflammatory infiltrate at 14 and 28 days. Sham group had no evident fibrosis and no inflammatory activity could be observed (Figure 1A and 1B). Mitotic and apoptotic levels were both increased in response to BDL. However we were unable to detect differences between BMC and PBS groups (data not shown).

Biochemistry

Biochemical analyses were performed at 2 and 4 weeks after BDL. AST and ALP levels were markedly increased in BMC and PBS groups 2 and 4 weeks after BDL ($p < 0.05$) compared to sham group. AST levels at 28 days decreased in all groups, comparing to 14 days ($p < 0.05$). ALT levels did not differ among the groups at 14 days and 28 days, being in or near the normal range (data not shown).

ALP levels at 28 days in BMC group showed intermediate levels compared to sham and PBS groups, being statistically different from both ($p < 0.05$). ALP levels decreased in bone marrow group and were maintained in sham and PBS animals (Table 1).

Cell tracking

DAPI positive cells could be visualized in livers and lungs from treated animals. Cells were located on liver parenchyma mostly as single cells. Around bile duct proliferation areas, a pronounced number of stained cells could be visualized (figure 3A), suggesting that these cells could be participating somehow in the formation of new ducts. On the other hand, other cells assumed a hepatocyte-like phenotype (Figure 3B). In the lungs, cells were seen mainly around the veins (data not shown). Positive results for the SRY PCR confirmed the presence of donor-derived cells in both organs (figure 4). We were not able to visualize fluorescent cells in organs from the other two groups. PCR for the SRY gene was also negative.

Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation was assessed in rat livers. We were able to demonstrate a significant increase in TBARS content in livers from PBS and BMC groups, compared to Sham animals ($p < 0.05$). However, cell therapy was not able to reduce the lipid peroxidation in BMC group ($p = 0.441$), showing results similar to PBS (figure 5).

DISCUSSION

The use of bone marrow cells (10) or its fractions (6) have been recently proposed as a new therapeutic approach in chronic liver disease. Bone marrow cells are a source readily available for transplantation purposes, which make them an appealing alternative.

In this work we verified the effects of bone marrow mononuclear cell transplantation in a rat model of chronic liver disease induced by common bile duct ligation. We were able to demonstrate a slower progression in collagen deposition in treated animals, but not a reversal in the bile duct proliferation.

The anti-fibrogenic ability of bone marrow cells has been shown in recent years (11) and it has not been only associated to bone marrow stem cells. Recent papers demonstrated that macrophages may have a key role in reduction of liver fibrosis, secreting matrix metalloproteinase (MMP)-9 and MMP-13 (12). Other types of bone marrow cells were also proven to contribute to hepatic regeneration, through fusion or transdifferentiation into cells from hepatic lineage (13). In this study we were not able to define by which mechanism the recovery occurs, it is possible that these mechanisms occur together in liver recovery mediated by bone marrow cells.

On the other way, it has been recently suggested that mesenchymal bone marrow cells could carry a pro-fibrogenic potential (7). Our results do not support those findings;

however it is an important issue to be cleared, as clinical trials using bone marrow cells are already ongoing (14).

Presence of cells in livers and lungs from treated animals could be assessed by fluorescent DAPI staining and confirmed by PCR for detection of male derived cells. Fluorescent analysis revealed that most cells were placed in areas of bile duct proliferation. Whether these cells are attracted to areas of higher damage and/or are differentiating into cholangiocytes we could not determine. Other groups did not verify significant stem cell differentiation into cholangiocytes in alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis (15). This may suggest that BMC could be only responding to cytokine release.

Biochemical parameters analyzed revealed a reduction in alkaline phosphatase levels in BMC treated rats. This reduction was small but significant and may indicate a reduction in biliary damage after treatment. The mechanisms that could justify this reduction are still unknown.

Lipid peroxidation was increased after BDL, as reported by Tieppo et al (16). However, cell therapy was not able to decrease TBA-RS levels. It has been recently shown that antioxidant substances are able to decrease oxidative stress levels in BDL rats (17). These results suggest that these therapeutic approaches act through different pathways and may act synergistically. Thus, a combined antioxidant and cell therapy approach could be worth trying.

Our results suggest that bone marrow cells can diminish the progression of collagen deposition in chronic liver disease induced by BDL, being a potential alternative for the treatment of liver fibrosis. Further research is still important in order to assess the safety of this procedure if bone marrow derived cells are to be clinically implemented for these conditions with well-designed and controlled clinical trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank FIPE-HCPA, CAPES and CNPq for financial support.

REFERENCES

1. Baldo G, Melendez M, Nonemacher K, Ayala A, Lima L, Segal SL, Kieling C, Vieira SMG, Ferreira C, Silveira TR, Giugliani R, Matte U. Prevalence of Pi*S and Pi*Z alleles of alpha-1-antitrypsin in Brazilian Children with liver disease. *Genetics and Molecular Biology*, 2008; *in press*.
2. Ferreira CT, da Silveira TR. Viral hepatitis prevention by immunization. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82: S55-66.
3. Goldani HA, Matte US, Ramos AR, Costa TG, Winkelmann LV, Meurer L, Vieira SM, Kieling CO, Silveira TR. The role of food restriction on CCl₄-induced cirrhosis model in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2007; 58(5):331-7.
4. Bezerra JA. The next challenge in pediatric cholestasis: deciphering the pathogenesis of biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006; 43 Suppl 1:S 23-31.
5. Iredale JP. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *BMJ* 2003; 327:143.

6. Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*. 2004 Jul 15;78(1):83-8
7. di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, Sanavio F, Cannito S, Zamara E, Bertero M, Davit A, Francica S, Novelli F, Colombatto S, Fagioli F, Parola M. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*. 2008; 57: 223-231.
8. Mencin A, Seki E, Osawa Y, Kodama Y, de Minicis S, Knowles M and Brenner DA. Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology* 2007; 46: 1443-1452.
9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem* 1979; 95; 351-358.
10. Cao BQ, Lin JZ, Zhong YS, Huang SB, Lin N, Tang ZF, Chen R, Xiang P, Xu RY. Contribution of mononuclear bone marrow cells to carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*. 2007;13(12):1851-1854.

11. Sakaida I, Tarei S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311.
12. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2007;45(1):213-22.
13. Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow cells and liver disease. *Gut* 2007; 56: 716-724.
14. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, Braga EL, de Carvalho WA, Genser B, dos Santos RR, Lyra LG. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13: 1067-1073.
15. Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, Yamagiwa Y, Fukushima K, Gershwin ME, Shimosegawa T. Lack of evidence that bone marrow cells contribute to cholangiocyte repopulation during experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Liver Int*. 2006; 26: 457-466.

16. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol* 2005; 42: 244-231.

17. Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JA, Picada JN. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:1140-1145.

Table 1: Biochemical findings in Sham (n=5), PBS (n=5) and Bone marrow cells (n=6) groups 14 and 28 days after bile duct ligation. Results are expressed as U/mL (mean \pm s.d.)

	AST		ALP	
	14d	28d	14d	28d
Sham	208.6 \pm 40.2 ^a	119.8 \pm 20.4 ^{a, b}	64.2 \pm 16.5 ^a	57.4 \pm 12.4 ^a
PBS	372.2 \pm 32.3	244.2 \pm 21.3 ^b	261.4 \pm 34.5	241.8 \pm 40.1
BMC	369.7 \pm 86.9	252.3 \pm 111.4 ^b	227.8 \pm 30.6	180 \pm 56.4 ^{b, c}

^a $p < 0.05$ compared to PBS and BMC within the same time point- Oneway ANOVA e Duncan's test *post hoc*.

^b $p < 0.05$ comparing 14 and 28 days within the same group. Student's t test for paired samples.

^c $p < 0.05$ compared to PBS and Sham group. ANOVA for repeated measures and Duncan test for multiple comparison (group interaction).

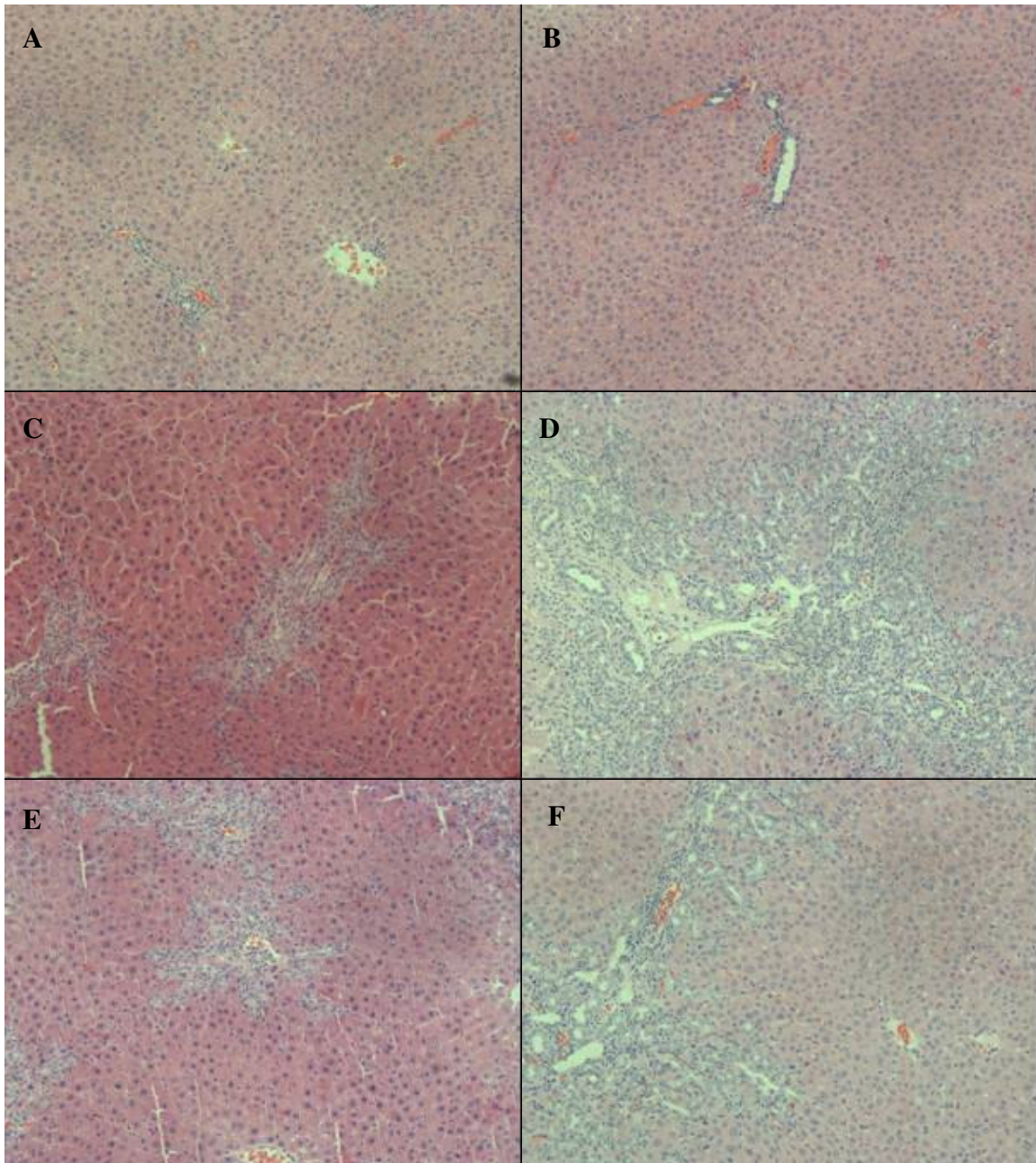


Figure 1 : Liver sections from sham, PBS and BMC groups two (A,C and E) and four (B, D, F) weeks after common bile duct ligation. A and B) Sham group. C and D) PBS group. E and F) BMC group. Magnification 200X.

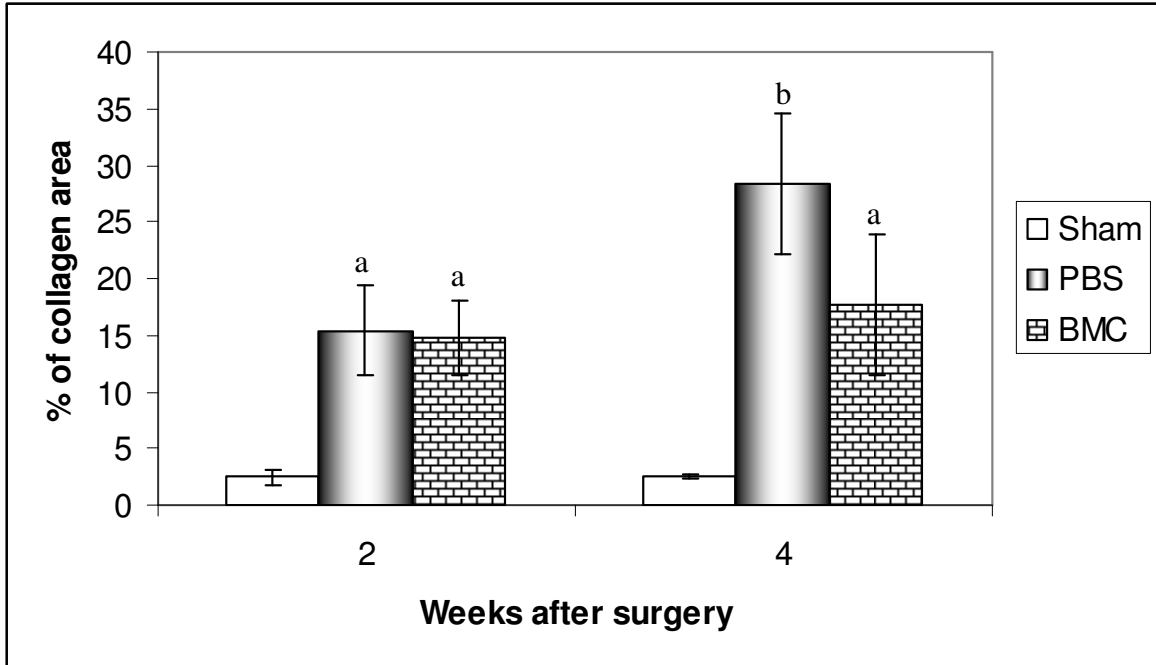


Figure 2: Percentage of collagen area in livers from sham, PBS and BMC groups 14 and 28 days after common bile duct ligation. Analysis was performed by Sirius red staining and quantified using adobe Photoshop CS3. Individual results were expressed as mean of 10 portal tracts analyzed in each sample. Results are expressed as mean \pm s.d.

^a $p < 0.01$ compared to sham group at same time (2 or 4 weeks), Oneway ANOVA and Duncan's test *post hoc*

^b $p < 0.01$ compared to BMC and Sham groups, ANOVA for repeated measures and Duncan's test for multiple comparison (group interaction).

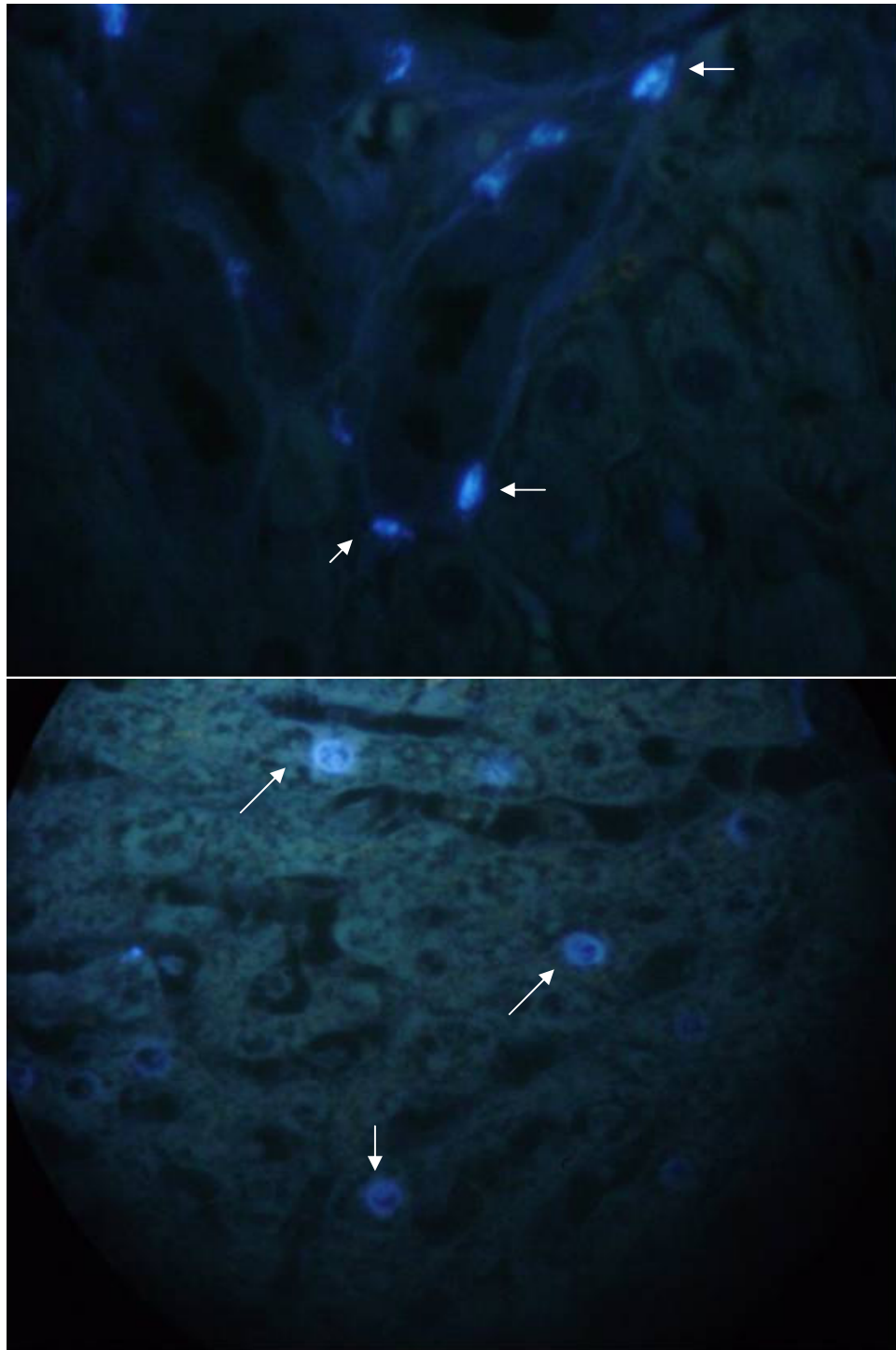


Figure 3: Fluorescent cells (arrows) in livers from bone marrow treated rats. A) cells placed around ductular proliferation area. B) Cells in liver parenchyma with hepatocyte-like phenotype. Magnification 2000X.

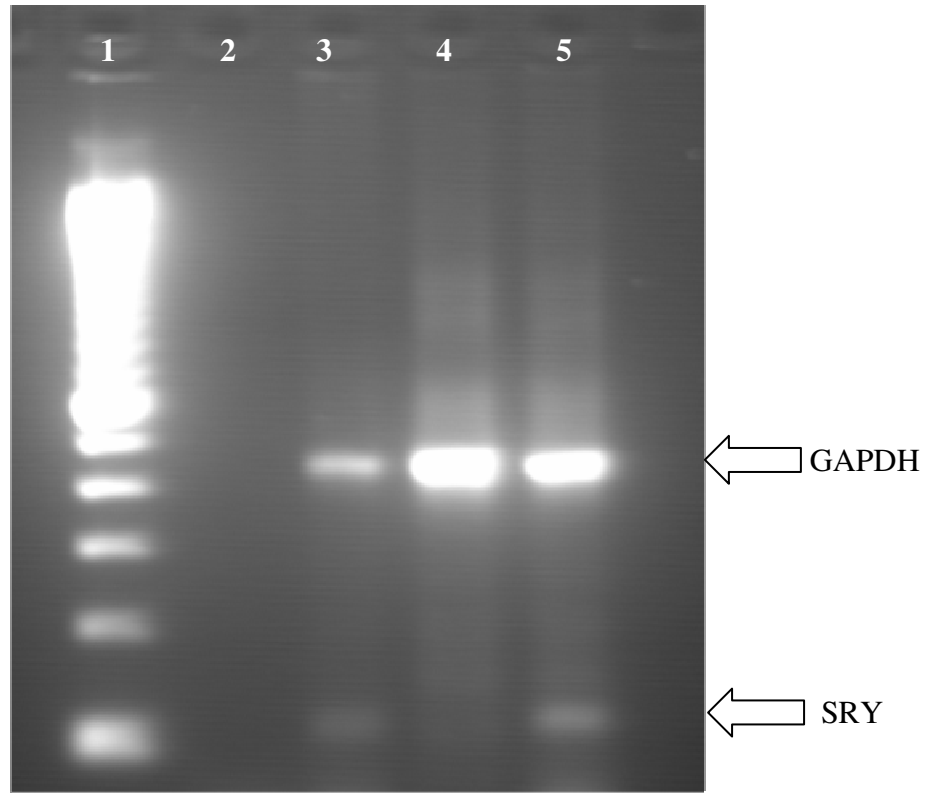


Figure 4: Visualization of PCR products for SRY (102 bp) gene in rat livers. Lane 1: 100 bp ladder; lane 2: negative control; lane 3: positive control (PCR from male DNA); lane 4: PBS group; Lane 5: BMC group. GAPDH (429bp) was used as internal control.

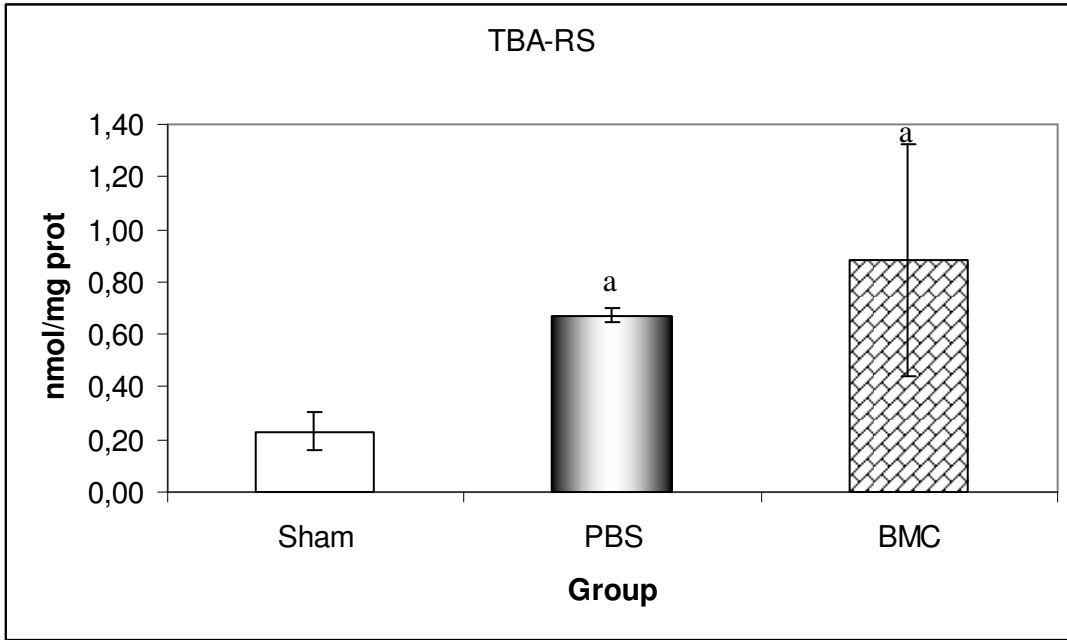


Figure 5: Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) in liver specimens from rats four weeks after common bile duct ligation. Results are expressed as mean \pm s.d.

^a $p < 0,05$ compared to Sham group, Oneway ANOVA and Duncan's test *post hoc*

5. DISCUSSÃO

A capacidade regenerativa do fígado é conhecida desde a mitologia grega (Theise e Krause, 2002) e ocorre de maneira diferente dos demais tecidos do corpo. Em tecidos como a pele (Alonso e Fuchs, 2003), o tendão (Bi et al, 2007) e mesmo o cérebro (Kornblum, 2007) a reposição celular é realizada através de um *pool* de células-tronco tecido-específicas. Essas células são capazes de realizar divisão assimétrica, podendo se auto-renovar e gerar células diferenciadas. No tecido hepático, porém, são as células do parênquima hepático (hepatócitos) que se dividem e repõem rapidamente as células perdidas (Taub, 2004).

O fígado, como os demais órgãos, também possui uma população de células-tronco tecido-específicas. São as chamadas células-tronco hepáticas, células precursoras hepáticas ou células ovais (em murinos). Essas células parecem replicar-se em casos de dano hepático nos quais as células do parênquima não conseguem se dividir, como no caso do dano por retrorsina ou galactosamina (Fausto, 2000).

A resposta do tecido hepático à terapia celular tem sido investigada nos últimos anos, com relatos de sucesso em vários modelos pré-clínicos de lesão hepática aguda e crônica como, por exemplo, os relatados por di Campli (2005) e Higashiyama (2007). Diferentes modelos foram utilizados, com diferentes tipos celulares, levando à proposição de distintos mecanismos de ação. A partir disto, neste trabalho buscamos o desenvolvimento de um protocolo pré-clínico comum à lesão hepática aguda e crônica através da terapia com células mononucleares de medula óssea, obtidas através da purificação por gradiente de Ficoll. A análise das células purificadas demonstrou a presença de mais de 80% de células mononucleares (linfócitos e monócitos), contendo em sua

composição cerca de 20% de células jovens ou imaturas (distinguíveis pela maior basofilia do citoplasma), e poucos granulócitos (figura 3).

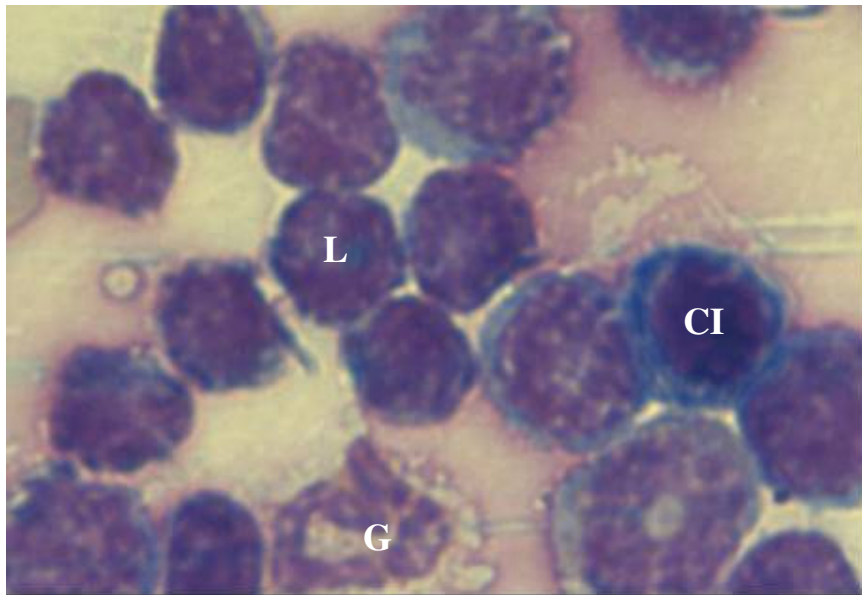


Figura 3: Caracterização da população celular obtida na purificação de células de medula óssea por Gradiente de Ficoll. As células foram coradas usando técnica de May Grunvald-Giemsa. As letras na figura indicam um: L- linfócito. G- granulócito. CI- célula imatura. Aumento: 2000X

A indução da lesão hepática aguda foi realizada através da administração de CCl_4 1,25 mL/Kg em ratas wistar (Wong et al, 2000). O tetracloreto de carbono é um modelo animal de IHA amplamente utilizado desde a década de 1960 para indução de lesão hepática aguda e crônica, e seu mecanismo de ação já é conhecido. Dados da literatura mostram que uma dose de 1 ml/kg intraperitoneal resulta em uma sobrevivência de 90% dos animais (Pilichos et al, 2004). Em nosso estudo, a dose de 1,25 ml/kg resultou em uma sobrevivência de 70%, em 72h.

A dose e via de administração escolhidas para este trabalho se basearam em estudos prévios da literatura (Wong et al, 2000). Ainda assim, um estudo-piloto avaliando a cinética da lesão pelo tetracloreto de carbono e a mortalidade produzida pelo modelo foi realizado. Para tanto, 15 animais foram sacrificados 24, 36 e 48 horas após a indução da lesão, e o fígado, pulmão, cérebro e rins foram retirados para análise histológica. Não houve qualquer alteração histológica significativa nos órgãos analisados, a não ser no tecido hepático. Essa avaliação, porém, não descarta a ocorrência de pequenas lesões nestes órgãos, como já descrito por Ogeturk e colaboradores (2005) para o rim.

Vinte e quatro horas após lesão, foi possível observar áreas de necrose ao redor de veias centrilobulares, com o aparecimento de esteatose micro e macrovesicular por todo o parênquima hepático. O aumento concomitante nos níveis séricos de ALT serviu para defini-la como marcador da lesão hepática neste modelo. Dessa forma, estabeleceu-se como requisito para inclusão no estudo um aumento de três vezes no valor médio inicial da enzima 24 horas pós a administração do CCl₄.

Em 36 e 48 horas, os níveis de ALT começaram a cair, e o dano histológico passou a se refletir majoritariamente através de esteatose, degeneração hidrópica e infiltrado inflamatório. O acúmulo de lipídios ocorre devido à falha do órgão lesionado em transportar lipoproteínas de baixa densidade ricas em triglicerídeos para o plasma. Já a degeneração hidrópica é devida a alterações na permeabilidade da membrana plasmática, levando a uma hiperhidratação celular, conforme já descrito por Recknagel e colaboradores (1989).

Dez animais foram mantidos até 72 horas para verificar a mortalidade do modelo experimental proposto. Três deles acabaram morrendo antes das 72h, levando a uma sobrevivência de 70% nestas condições experimentais. A análise histológica destes animais

revelou intensa necrose no fígado, indicando que a mortalidade observada foi provavelmente devida à sobredose do CCl₄. Os ratos que sobreviveram até 72 horas foram sacrificados em câmara de CO₂. Os níveis de ALT se mostraram um pouco elevados, cerca de duas vezes maiores do que os normais. A análise histológica revelou presença de esteatose e degeneração hidrópica leve, com a arquitetura hepática demonstrando pequenas alterações. Nossos achados histológicos e bioquímicos estão de acordo com os da literatura (Chung et al, 2005), que demonstram cinética de lesão semelhante quando injetada uma dose de 1 ml/kg de CCl₄ intraperitoneal, com pico da ALT 24 horas pós lesão e posterior recuperação do órgão. A recuperação do tecido hepático era esperada e se justifica devido à já mencionada capacidade de regeneração do tecido (Taub, 2004).

Esse estudo piloto foi de suma importância para decidir o momento da injeção das células e o tempo de acompanhamento dos animais. Baseado nestes dados e tentando mimetizar uma situação clínica, decidiu-se pela injeção celular 24 horas após a lesão e por um tempo de seguimento de 72 horas nestes animais.

O modelo de ligadura de ducto biliar comum (LDB) foi utilizado para induzir lesão hepática crônica nos ratos. Estudos prévios (Levy et al 1993; Tieppo et al, 2006) demonstraram que a este modelo estão associadas importantes e progressivas mudanças na arquitetura hepática, com infiltrado inflamatório, proliferação de ductos biliares ao redor de espaços porta e fibrose hepática associada a estas áreas. Estas características estão de acordo com os achados histológicos deste trabalho, que confirmam a reprodutibilidade do modelo animal.

No total, sete animais não sobreviveram até o final do estudo neste modelo, o que gera uma mortalidade de aproximadamente 30% (7/23). Destes, quatro desenvolveram ascite e acabaram morrendo antes de duas semanas. Nos animais que sobreviveram por 28

dias observou-se visível hipertensão portal, marcada pela dilatação das veias esplênicas. Estes achados também se mostram de acordo com dados descritos previamente para este modelo (Yaari et al, 1992).

Além disso, Tieppo e colaboradores (2007) verificaram que este modelo produz dano ao DNA, aumento de estresse oxidativo e mudanças na gasometria arterial, com diminuição da pressão parcial de oxigênio arterial e saturação de oxigênio da hemoglobina. Por esta última razão, este modelo experimental vem sendo considerado na literatura como um modelo de síndrome hepatopulmonar (Fallon et al 1997, Luo et al, 2005). Neste experimento o sangue dos animais foi coletado após 28 dias para verificação de parâmetros relacionados à gasometria arterial, porém os resultados se mostraram muito díspares, indicando problemas provavelmente no processo de coleta do material. Dessa forma, os dados não puderam ser usados para caracterização da síndrome hepatopulmonar.

No presente estudo, as enzimas ALT, AST e FA foram utilizadas como marcadores séricos da lesão hepática. Após 14 e 28 dias, houve um aumento significativo nos níveis de AST e FA nos grupos com LDB (grupos PBS e BMC), em comparação ao grupo sham. Estes resultados confirmam o dano produzido neste modelo e estão de acordo com estudos prévios (Tieppo et al, 2005). Não houve alteração nos níveis de ALT, o que vai de encontro a estudos de Tieppo e colaboradores (2005), que encontraram um aumento de cerca de duas vezes nos níveis dessa enzima 28 dias após a lesão. Além disso, outro estudo em modelo animal de proliferação ductular e colestase demonstrou que o aumento da ALT é um evento que acontece de 3-5 semanas após o insulto (Beaussier et al, 2005).

A avaliação da resposta dos animais ao tratamento teve desfechos diferentes nos dois modelos. No modelo de IHA o principal desfecho foi considerado a sobrevida, enquanto no modelo de LDB a fibrose associada ao tecido hepático foi avaliada como

principal resultado. Isto se deve ao fato de que no modelo de LDB um maior grau de fibrose está diretamente correlacionado ao estabelecimento de nódulos de regeneração, o que caracteriza a cirrose biliar, que por sua vez se correlaciona a um pior prognóstico da doença.

A diferença na sobrevida observada entre os grupos no modelo de IHA foi de 43%. Nenhum animal morreu no grupo tratado, enquanto no grupo sham a mortalidade atingiu 57%. O grupo sham apresentou uma mortalidade maior que a apresentada pelo modelo animal (30%) sem cirurgia, conforme observado no estudo piloto. Essa diferença pode ser atribuída ao processo invasivo utilizado para a administração das células (veia porta). Esta via de administração foi escolhida baseada em estudos prévios que demonstraram o enxerto das células no fígado utilizando a via intra-portal (Fan et al, 2001, Wu et al, 2005). Além disso, têm sido a via de escolha em ensaios clínicos (Gordom et al, 2006), porém com acesso por cateterismo, e não por laparotomia.

Uma melhora na sobrevida de animais tratados após terapia celular já foi demonstrada por outros grupos. Di Campli e colaboradores (2005) relataram um aumento de 50% na sobrevida de ratos tratados intraperitonealmente com células tronco de cordão umbilical, após lesão hepática aguda causada por álcool alílico. Nosso grupo recentemente demonstrou resultados similares em modelo animal de lesão hepática por paracetamol (Belardinelli et al, 2008).

A análise do tecido hepático por microscopia de fluorescência revelou a presença de células marcadas com formatos distintos. Algumas células possuíam núcleo arredondado e apresentavam formato de hepatócito, sugerindo uma possível diferenciação das células de medula óssea em células hepáticas. No entanto, outras possuíam fenótipo indefinido, com menor relação núcleo/citoplasma. Diversos grupos já demonstraram a capacidade *in vitro* e

in vivo das células-tronco de medula óssea (de origem mesenquimal ou hematopoiética) em gerar células hepáticas (Lagasse et al, 2000, Shi et al, 2005; Shu et al, 2004). Outros grupos por sua vez comprovaram que as células-tronco são capazes de fundir com hepatócitos e reestabelecer sua função (Alvarez- Dolado et al, 2003). Estudos recentes sugerem que não somente células-tronco, mas também outros tipos celulares presentes na medula óssea, tais como monócitos, possuem essas mesmas capacidades de fusão e diferenciação (Ruhnke et al, 2005). Se os processos de fusão ou diferenciação ocorrem no modelo animal estudado é impossível dizer apenas pela marcação fluorescente. Para definir tais eventos, técnicas como microscopia confocal seriam necessárias. Ainda assim, a marcação com o corante nuclear DAPI se mostrou bastante eficiente para definir a localização das células, sem que fosse necessária a manipulação genética e inserção de genes marcadores nas mesmas.

Não foram localizadas células fluorescentes no tecido pulmonar e esplênico dos animais tratados (dados não mostrados), o que sugere a migração preferencial das células para o fígado. Teorias a respeito do mecanismo pelo qual as células migrariam para o tecido hepático lesionado vêm sendo discutidas, mas estudos publicados nos últimos anos parecem concordar que o mecanismo se dá através do aumento da expressão do *stromal derived factor 1 alpha* (SDF-1 α) no tecido hepático com lesão (Dalakas et al, 2005, Jung et al, 2006), o que recrutaria as células para este tecido.

Outro ponto importante a ressaltar é o aumento no número de mitoses encontrado no tecido hepático dos animais tratados. Baseado neste dado, nossa hipótese é de que as células de medula óssea estejam secretando citocinas que estimulariam a divisão dos hepatócitos durante o processo de lesão. Essa hipótese se fortalece se analisarmos o trabalho de Piscaglia e colaboradores (2005), que verificaram, através de microarrays de expressão, como a injeção de células-tronco influencia a expressão gênica após dano

hepático agudo. Os pesquisadores encontraram uma superexpressão de genes relacionados a processos de proliferação celular e ativação de ciclo celular, tais como ciclinas, oncogenes e fatores de crescimento. Dessa forma, o aumento do número de mitoses verificado no nosso estudo poderia estar relacionado a uma resposta celular à superexpressão destes genes.

A diminuição nos níveis de ALT encontrados 72h após a indução da lesão no grupo tratado sugerem uma recuperação e regeneração mais rápida do tecido hepático destes animais, quando comparados ao grupo sham. Jung e colaboradores (2006) também reportaram uma normalização mais rápida nos níveis dessa enzima após terapia celular.

Uma característica da IHA é a encefalopatia, a qual pode levar ao estado de coma. Não há um exame específico para detectá-la, no entanto ela pode ser acessada indiretamente através dos níveis de amônia (Belanger e Butterworth 2005). Infelizmente, não foi possível realizar este teste em nosso laboratório. Ainda assim, os animais lesionados pelo CCl₄ se mostraram visivelmente letárgicos, sugerindo que certo grau de encefalopatia foi induzido neste modelo animal. Outros grupos já demonstraram letargia associada à lesão pelo CCl₄ (Mitra et al, 2001). Porém, não foi possível observar se havia diferença no grau de encefalopatia entre os animais tratados e não-tratados.

A análise histológica nos ratos sacrificados após 72h não demonstrou expressivas diferenças entre os grupos, uma vez que ambos estavam finalizando o processo de regeneração hepática. Ao contrário, os animais do grupo sham que morreram durante o experimento apresentaram marcada necrose no tecido hepático, formando “pontes” entre os vasos.

No modelo de ligadura de ducto biliar foi possível detectar uma redução na progressão da fibrose hepática após o tratamento com células da medula óssea. Resultados

similares em outros modelos de fibrose hepática foram encontrados por Sakaida e colaboradores (2004) e, mais recentemente, por Higashiyama e colaboradores (2007). Esses resultados diferem dos recentemente encontrados por di Bonzo e colaboradores (2008), que relataram um potencial pró-fibrogêncio de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea.

Os mecanismos pelos quais as células de medula óssea atuam na regressão da fibrose ainda não estão completamente desvendados. Além dos já citados processos de diferenciação e fusão celular, alguns autores (Fang et al, 2004) demonstraram que animais submetidos à lesão hepática crônica e tratados com células-tronco mesenquimais apresentam redução nos níveis de *transforming growth factor-β* (TGF-β). Essa citocina está diretamente envolvida na ativação da célula estelada hepática, considerada a principal responsável pelo processo de fibrose no fígado.

Além disso, outros trabalhos têm demonstrado que após a infusão de células de medula óssea, macrófagos transplantados começam a sintetizar metaloproteinases de matriz (MMP)-9 e 13, e dessa forma, degradam o colágeno depositado no tecido hepático (Higashiyama et al, 2007). No entanto ainda não é possível determinar como as células agem sobre o tecido para diminuir o dano fibrótico em nosso modelo. As demais alterações histológicas (proliferação de ductos e infiltrado inflamatório) nos grupos com ligadura tratados e no grupo PBS foram semelhantes, de forma que as células parecem agir especificamente sobre a deposição de colágeno. Os resultados da avaliação do número de mitoses e apoptoses mostraram um aumento de ambos eventos celulares nos grupos submetidos à LDB, porém não houve diferenças entre os animais submetidos à terapia celular e os que receberam PBS.

As análises bioquímicas realizadas mostraram uma pequena, porém significativa, diminuição na enzima fosfatase alcalina após o tratamento. Essa diminuição sugere que as células transplantadas podem, de alguma forma, diminuir a lesão canalicular associada ao dano, através de mecanismos ainda desconhecidos. A elevação dos níveis séricos de FA em pacientes com doença hepatobiliar é secundária à síntese da enzima no fígado e sua posterior liberação no soro. Os ácidos biliares induzem a síntese de FA que atua na membrana do hepatócito, levando à ruptura de organelas hepáticas e tornando solúvel a FA ligada às membranas. A FA é o exame mais comumente utilizado para identificar processos colestáticos em pacientes com enfermidade hepatobiliar ocasionado por interrupção do fluxo biliar (Tieppo, 2006). Os outros parâmetros analisados não mostraram diferenças entre os grupos com ligadura de ducto, apenas com relação ao controle. Isso se deve ao fato da lesão ser contínua neste modelo animal, pois em nenhum momento se desfaz a obstrução do ducto.

Neste modelo experimental optou-se pela injeção de células através da veia mesentérica, uma vez que os animais já haviam sofrido processo cirúrgico para indução da lesão e a acessibilidade da veia porta estava dificultada, em função da primeira cirurgia. Mesmo assim, como no modelo de lesão hepática aguda, as células marcadas com DAPI puderam ser identificadas no tecido hepático. Da mesma forma, se apresentaram com fenótipos diferentes, com algumas possuindo formato similar ao de hepatócitos. Diferentemente do modelo agudo, um grande número de células foi identificado ao redor dos ductos biliares em proliferação. Se estas células se situavam nestes locais por ser uma área de lesão e conseqüente liberação de citocinas, ou se de alguma forma elas contribuem para a formação de novos ductos biliares ainda não pode ser definido. Estudos prévios, no

entanto, não conseguiram demonstrar a diferenciação *in vivo* de células tronco de medula óssea em colangiócitos (Moritoki et al, 2006).

O PCR para o gene SRY foi utilizado como prova adicional do enxerto das células no tecido hepático do hospedeiro. Essa técnica permite a identificação de células mesmo caso o corante não possa ser visualizado ou caso a fluorescência observada seja muito fraca. Ao contrário dos resultados encontrados após a lesão hepática aguda, no modelo de LDB foi possível observar a presença de células no tecido pulmonar, também confirmadas pelo PCR do SRY. O papel destas células no tecido pulmonar não pode ser determinado pelo nosso grupo. A hipótese mais provável é que as células podem se apresentar neste tecido devido apenas a alterações na microvasculatura deste órgão pela lesão hepática crônica. No entanto esses dados são inconclusivos e outros estudos deverão ser realizados para desvendar o motivo da migração celular para o pulmão.

O dano oxidativo produzido após a LDB já foi descrito na literatura, e os dados encontrados no estudo da peroxidação lipídica pela medida de TBA-RS estão de acordo com dados prévios (Tieppo et al, 2005). No entanto, não foi observada uma melhora nesse aspecto nos animais tratados. O uso de antioxidantes já demonstrou melhorar quadros de fibrose neste modelo animal, através da diminuição do estresse oxidativo (Toklu et al, 2007). Essas observações nos levam a sugerir uma terapia combinada, envolvendo terapia celular e terapia antioxidante, uma vez que ambas parecem agir diminuindo a fibrose do tecido por mecanismos diferentes.

Considerados em conjunto, nossos resultados sugerem mecanismos de ação diferentes da terapia celular em resposta ao dano agudo e crônico. Estes mecanismos que tornam efetiva a terapia celular devem ser desvendados para guiar melhor os ensaios clínicos. Já existem estudos para doença hepática crônica, com resultados díspares (Tabela

4). Diferença nas células utilizadas, via de administração e doenças tratadas tornam difícil uma comparação objetiva entre os trabalhos.

Tabela 3: Ensaios clínicos envolvendo transplante de células de medula óssea e lesão hepática crônica.

Número de pacientes e doença	Células injetadas e via de injeção	Resultados	Referência
n= 3 Câncer hepático	Células CD 133+ Veia porta	Procedimento bem tolerado Aumento na regeneração hepática	am Esch et al, 2005
n=5 Hepatite B ou C, álcool ou colangite esclerosante	De sangue periférico após G-CSF Veia porta ou artéria hepática	Melhoras na albumina e bilirrubina	Gordom et al, 2006
n= 9 Cirrose (score Child-Pug B e C)	Mononucleares de medula óssea Veia periférica	Procedimento bem tolerado Follow-up de 6 meses Melhora na albumina e score Child-Pug	Terai et al, 2006
n= 4 Cirrose descompensada	Células CD34+ de medula óssea Artéria hepática	Morte de 1 paciente por IHA Ensaio cancelado	Mohamadnejad et al, 2007
n= 10 Cirrose (Score Child-Pug B e C)	Células mononucleares de medula óssea Artéria hepática	Procedimento bem tolerado Pequenas alterações na albumina e bilirrubina	Lyra et al ,2007

A medula óssea parece ser a fonte mais adequada de células visando a terapias celulares. Ela contém uma população celular heterogênea que parece possuir um efeito somatório no tratamento de doenças hepáticas (Higashiyama et al, 2007; Russo et al, 2007). Além disso, possui a vantagem de permitir o auto-transplante, diminuindo a resposta imune associada ao procedimento. Também possui menos conflitos éticos quando comparada a outras fontes, como as células tronco embrionárias e as células de cordão umbilical.

Principalmente no caso da IHA, onde há um rápido desenvolvimento da doença, a rápida disponibilidade destas células também é um fator importante a ser considerado. Os ensaios clínicos para lesão hepática crônica vêm usando este tipo celular devido a estas características. Há apenas um relato de terapia celular em um caso de IHA, num paciente com lesão causada por Nimesulida. O paciente em questão demonstrou melhoras na função hepática, no entanto, acabou falecendo 50 dias após o procedimento devido a uma infecção bacteriana (Gasbarrini et al, 2007).

A IHA e a doença hepática crônica representam sérios problemas de saúde pública mundial. Novas terapias vêm sendo estudadas visando à melhora do quadro clínico de pacientes com essas enfermidades, uma vez que a demanda por órgãos ainda é muito maior que a disponibilidade. Dessa maneira, os resultados obtidos neste trabalho podem futuramente contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas aos quadros de lesão hepática aguda e crônica. Para tanto, estudos pré-clínicos de longo prazo ainda são necessários, visando a confirmar a segurança deste procedimento, para que então sejam desenvolvidos estudos clínicos que comprovem o potencial da terapia celular.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que

a) No modelo de lesão hepática aguda

- houve um significativo incremento na sobrevivência dos animais tratados com a terapia celular após a lesão hepática aguda;

- as células injetadas pela veia porta migram para o tecido hepático;

- a administração de células de medula óssea é capaz de diminuir os níveis de ALT 72 horas após a lesão e aumentar o número de mitoses no tecido hepático

- não houve diferenças histológicas entre os animais que sobreviveram até o final do estudo. No entanto, os animais que morreram antes das 72 horas apresentavam elevado grau de necrose celular.

b) No modelo de lesão hepática crônica

- houve uma redução nos níveis de FA no grupo tratado comparado ao grupo PBS, enquanto as transaminases não mostraram diferenças entre os grupos após o tratamento;

- o transplante de células de medula óssea foi capaz de diminuir a deposição de colágeno associada a este modelo animal;

- ocorre a migração de células transplantadas para o fígado e para o pulmão;

- a terapia celular não foi capaz de reverter o dano oxidativo a lipídios.

Dessa forma, nossos dados sugerem um efeito benéfico do transplante celular para as duas situações, no entanto, os resultados encontrados indicam mecanismos de ação diferentes destas células em resposta aos danos induzidos. Os resultados deste trabalho

juntamente com estudo destes mecanismos podem ajudar no desenvolvimento de futuros protocolos clínicos envolvendo esta abordagem terapêutica.

7. REFERÊNCIAS:

Abdel-Aziz G, Lebeau G, Rescan PY, Clément B, Rissel M, Deugnier Y, Campion JP, Guillouzo A. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rat. *Am J Pathol* 1990; 137: 1333-1342

Allen KJ, Buck NE, Williamson R. Stem cells for the treatment of liver disease. *Transplant Immunology* 2005; 15: 99-112.

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 Suppl 1:11830-11834.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; 425: 968-973.

am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschräder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.* 2005; 23: 463-470.

Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, Lienhart A, Scoazec JY, Rosmorduc O, Housset C. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol.* 2005; 42 :257-265.

Bélanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis.* 2005; 20(4):409-423.

Belardinelli MC, Pereira FS, Baldo G, Duarte MES, Kieling C, Tavares AMV, Meurer L, Silveira TR, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen- induced hepatic failure. *Toxicology*, 2008 *in press*.

Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S and Young MF. Identification of tendon stem/ progenitor cell and the role of extracellular matrix in their niche. *Nature medicine* 2007; 13: 1219-1227.

Bobbert M. Ethical questions concerning research on human embryos, embryonic stem cells and chimeras. *Biotechnol J* 2006; 1(12): 1352-1369.

Centeno MA, Bes DF, Sasbon JS. Mortality risk factors of a pediatric population with fulminant hepatic failure undergoing orthotopic liver transplantation in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med* 2002; 3: 227-233.

Chaparro CM, Neufeld LM, Tena Alavez G, Eguia-Líz Cedillo R, Dewey KG. Effect of timing of umbilical cord clamping on iron status in Mexican infants: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2006; 367: 1997-2004.

Chung H, Hong DP, Jung JY, Kim HJ, Jang KS, Sheen YY, Ahn JI, Lee YS, Kong G. Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on carbon tetrachloride-induced rat liver injury and regeneration. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 27-42.

Crosnier C, Stamataki D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet*. 2006; 7: 349-359.

Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J*. 2005;19:1225-1231.

Dhawan A, Mitry RR and Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 431-435.

di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, Sanavio F, Cannito S, Zamara E, Bertero M, Davit A, Francica S, Novelli F, Colombatto S, Fagioli F, Parola M. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*. 2008; 57: 223-231.

Di Campli C, Piscaglia AC, Rutella S, Bonanno G, Vecchio FM, Zocco MA, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Improvement of mortality rate and decrease in histologic hepatic injury after human cord blood stem cell infusion in a murine model of hepatotoxicity. *Transplant Proc* 2005; 37: 2707-2710.

Esteller, A. & Cordero, M. *Fundamentos da Fisiopatología IN Fundamentos da Fisiopatología* Gonzalez-Gallego J, Esteller A eds.. McGraw-Hill- Interamericana, Madrid, 1998.

Fallon MB, Abrams GA, McGrath JW, Hou Z, Luo B. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol.* 1997; 272: 779-784.

Fan TX, Hisha H, Jin TN, Yu CZ, Lian ZX, Guo SB, Cui YZ, Feng B, Yang GX, Li Q, Ikehara S. Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. *Stem Cells.* 2001;19(2):144-50

Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78: 83-90.

Fausto N. Liver regeneration. *Journal of Hepatology* 2000; 32: 19-31

Fernandes AO, Mies S. Hipertensão portal. In : Silva OC, Zucoloto S et al. Modelos animais de Pesquisa em Cirurgia 1998. São Paulo Ed Robe.

Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: Worldwide results. Transplantation 2006; 82: 441-449.

Forestier M, Solioz M, Isbeki F, Talos C, Reichen J, Krähenbühl S. Hepatic mitochondrial proliferation in rats with secondary biliary cirrhosis: time course and mechanisms. Hepatology 1997; 26: 386-391.

Friedman SL, Schiano TD. Cirrhosis and its sequelae. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Textbook of Medicine. 22nd ed. St. Louis: W. B. Saunders; 2004: 940-944.

Gasbarrini A, Rapaccini GL, Rutella S, Zocco MA, Tittoto P, Leone G, Pola P, Gasbarrini G, Di Campli C. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. Dig Liver Dis. 2007; 39:878-882.

Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M'Hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davies J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. Stem Cells. 2006;24:1822-1830.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493.

Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M, Watanabe T, Okano H, Matsuzaki Y, Shiota G, Okazaki I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 2007; 45: 213-222.

Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M. & Sharkis, S. J. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 6, 532-9 (2004).

Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, Yoo K, Moon IH, Han HS. Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev*. 2006; 15:687-695.

Johann LM, Oliveira JG, Moraes LR, Gonçalves LG, Kieling CO, Vieira SM, Ferreira CT, Pinto RB, da Silveira TR. Evolução de pacientes pediátricos com insuficiência hepática aguda por hepatite viral A nos últimos dez anos. *Revista HCPA* 2006; 26 (Supl 1): 155.

Kobayashi N, Okitsu T, Nakaji S, Tanaka, N. Hybrid bioartificial liver: establishing a reversibly immortalized human hepatocyte line and developing a bioartificial liver for practical use. *J Artif Organs* 2003; 6: 236-244.

Kornblum HI. Introduction to neural stem cells. *Stroke*. 2007; 38 (2 Suppl):810-815.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65: 305-311

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M.. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234

Lee WS, McKiernan P, Kelly DA. Etiology, outcome and prognostic indicators of childhood fulminant hepatic failure in the United kingdom. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 575-581.

Lei de Biosegurança Disponível em http://www.planalto.gov.br/CCIVIL/_Ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm Acesso em 02.01.2008 D.O.U. DE 28/03/2005,

Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology*. 1993;17:908-914.

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

Lorenti A, Argibay P, Gadano A. Combinando biomateriales y células: El hígado bioartificial. In Medicina Regenerativa y stem cells Argibay P. (comp). 1ª Ed- Buenos Aires: Universidade Nacional de Quilmes, 2005. 464p.

Luo B, Tang L, Wang Z, Zhang J, Ling Y, Feng W, Sun JZ, Stockard CR, Frost AR, Chen YF, Grizzle WE, Fallon MB. Cholangiocyte endothelin 1 and transforming growth factor beta1 production in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology*. 2005;129: 682-695.

Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D. Introduction: stem cell biology. In *Stem cell Biology*. Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D (editores). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.

Mendez-Otero R, do Valle CV, Mello LEA and Carvalho AC. Introdução às células-tronco. In *Terapias avançadas: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde*. Morales MM (editor). São Paulo: Atheneu, 2007. 3-8.

Minguell JJ, Erices A and Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226: 507-520.

Mitra SK, Venkataranganna MV, Gopumadhavan S, Anturlikar SD, Seshadri SJ, Venkatesha Udupa U. The protective effect of HD-03 in CCl4-induced hepatic encephalopathy in rats. *Phytother Res*. 2001 Sep;15(6):493-6.

Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, Kazemi Ashtiani S, Malekzadeh R, Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2007;13: 3359-3363.

Moritoki Y, Ueno Y, Kanno N, Yamagiwa Y, Fukushima K, Gershwin ME, Shimosegawa T. Lack of evidence that bone marrow cells contribute to cholangiocyte repopulation during experimental cholestatic ductal hyperplasia. *Liver Int.* 2006; 26: 457-466.

Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ and Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: A critical evaluation. *Liver Transplantation* 2000; 6: 21-31.

Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* 2007; 21:1345-1357.

Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97: 273-80.

Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 351-359.

Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22 Suppl 1: 79-84.

Pastor A, Collado PS, Almar M, Gonzalez-Gallego J. Antioxidant enzyme status in biliary obstructed rats: effects of N-acetylcysteine. *J Hepatol* 1997; 27: 363-370

Pilichos C, Perrea D, Demonakou M, Preza A, Donta I. Management of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats by syngeneic hepatocyte transplantation in spleen and peritoneal cavity. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2099-2102

Piscaglia AC, Zocco MA, Di Campli C, Sparano L, Rutella S, Monego G, Bonanno G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. How does human stem cell therapy influence gene expression after liver injury? Microarray evaluation on a rat model. *Dig Liver Dis*. 2005; 37: 952-693.

Polson J, Lee WM; American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology* 2005; 41:1179-1197.

Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, Fabregat I, Bueren JA, Theise ND, Segovia JC. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006; 43:108-116.

Rahman TM, Hodgson JF. Animal models of acute liver failure. *Int J Exp Path* 2000; 81: 145-157.

Recknagel RO, Glende EA, Dolak JA and Waller RL. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac Ther* 1989; 43: 139-154.

Rojkind M, Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. *Coll Relat Res* 1982; 2: 151-175

Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology*. 2005; 128(7):1774-1786.

Russo FP, Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow cells in the liver: diverse cells, diverse effects. *Hepatology*. 2007; 46: 604-605;

Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1404.

Schiodt FV, Rochling FA, Casey DL, Lee WM. Acetaminophen toxicity in a Urban County hospital. *New England Journal of Medicine*. 1997; 337: 1112-1118.

Shi J, Aisaki K, Ikawa Y and Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998; 153: 515-525

Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatology Res.* 2005; 31: 223-231.

Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822.

Stolz A. Liver physiology and metabolic function In Feldman: Sleigenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease. Feldman M, Friedman LS and Sleisenger MH (editores) . Elsevier, Philadelphia, EUA 2002; 1202-1227

Taub R. Liver refeneration: from mith to mechanism. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 2004; 5: 836-847.

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.* 2006; 24: 2292-2299.

Theise ND e Krause DS. Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. *Cell and developmental biology* 2002; 13: 411-417.

Tieppo J. Efeitos da quercetina no pulmão de ratos com ligadura de ducto biliar comum-um modelo de síndrome hepatopulmonar/ Juliana Tieppo: orient. Norma Possa Marroni. Porto Alegre: UFRGS 2006, 126 fl.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Silva Vaz MF, Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP, Henriques JA, Picada JN. Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 1140-1145.

Tieppo J, Vercelino R, Dias AS, Marroni CA, Marroni N. Common bile duct ligation as a model of hepatopulmonary syndrome and oxidative stress. *Arq Gastroenterol.* 2005; 42: 244-251.

Toklu HZ, Dumlu MU, Sehirli O, Ercan F, Gedik N, Gökmen V, Sener G. Pomegranate peel extract prevents liver fibrosis in biliary-obstructed rats. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59: 1287-1295.

Van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA. Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 2004; 25:1613-1625.

Van Thiel DH, Brems J, Nadir A, Idilman R, Colantoni A, Holt D, Edelstein S. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2001; 36: 1-4.

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897-901.

Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med*. 2004; 10: 744-751.

Wong CK, Ooi VEC and Ang PO. Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere* 2000; 41; 173-176

Wu, L. M., Li, L. D., Liu, H., Ning, K. Y. & Li, Y. K. Effects of Guiyuanfang and autologous transplantation of bone marrow stem cells on rats with liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11; 1155-1160

Yaari, A., Sikuler, E., Keynan, A. & Ben-Zvi, Z. Bromosulfophthalein disposition in chronically bile duct obstructed rats. *J Hepatol* 1992; 15: 67-72