



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Investigação do Potencial Terapêutico das Células
Mesenquimais de Medula Óssea em um Modelo de
Lesão Hepática Crônica

ADRIANA BASTOS CARVALHO

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISIOLOGIA

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Adriana Bastos

Investigação do Potencial Terapêutico das Células Mesenquimais de Medula Óssea em um Modelo de Lesão Hepática Crônica

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – IBCCF, 2008.

Orientadores: Campos de Carvalho, Antonio Carlos e Goldenberg, Regina Coeli dos Santos.

1. Cirrose hepática
2. Medula Óssea
3. Células Mesenquimais
4. Terapia Celular

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. II. Título.

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Cardiologia Celular e Molecular e Eletrofisiologia Cardíaca Antônio Paes de Carvalho do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, sob orientação do Professor Doutor Antonio Carlos Campos de Carvalho e da Professora Doutora Regina Coeli dos Santos Goldenberg. Recebeu o apoio financeiro das entidades: CNPq, FAPERJ, CAPES, IMBT e FUJB.

Contou ainda com a grande colaboração da Professora Doutora Christina Maeda Takyia do Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Histologia e Embriologia da UFRJ, do Professor Doutor Guilherme Ferreira da Mota Rezende do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – HUCFF – e da Doutora Célia Maria Coelho Resende do Departamento de Radiologia do HUCFF.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que além de professor e inspiração profissional, me ensinou que o mundo sempre será pequeno para tudo o que é possível sonhar em fazer.

À minha mãe, absolutamente iluminada, que sempre me guiou pelo caminho certo mesmo que eu não percebesse.

À minha irmã pelo exemplo de persistência e de coragem.

Aos meus irmãos pela paciência e pelo carinho.

Ao meu amor por ter trilhado esse caminho desde o início ao meu lado, pelo apoio, compreensão e dedicação.

À Beba minha admiração por ser uma batalhadora e por seu talento nato para o laboratório.

À minha avó por transmitir sua sabedoria sobre as voltas da vida.

À Professora Regina Goldenberg, mola-mestra do laboratório, pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Professores Guilherme Rezende e Christina Takyia e à Doutora Célia Resende por me ensinarem tanto sobre o fígado.

Aos amigos: Luiz Fernando, Elida, Juliana e Bruno por toda a ajuda nesses dois anos de muito trabalho.

A todos os outros amigos do laboratório pela boa convivência e paciência: Esporcatte, Karina, Renato, Andreza, Tais, Leandro, Juliana Silva, Juliana Passipieri, Luiza, Ramon, Patrícia Fidelis, Fernanda, Débora França, João Pedro, Márcia, José Carlos, Conceição e Tiago.

A todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

“Imagination is more important than knowledge”

Albert Einstein

RESUMO

O objetivo do nosso estudo foi avaliar o potencial terapêutico das células mesenquimais do estroma de medula óssea (MSC) em um modelo de lesão hepática crônica. Quatorze ratos fêmea da cepa Wistar foram alimentadas exclusivamente com uma dieta alcoólica líquida e receberam injeções intraperitoneais de tetracloreto de carbono em dias alternados durante 15 semanas. Após esse período, 8 animais (grupo tratado) tiveram 1×10^7 células injetadas pela veia porta, enquanto 6 animais (grupo placebo) receberam veículo. Foi realizada bioquímica do sangue para avaliar os níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e albumina antes e 1 e 2 meses após a infusão das células. A presença de fibrose foi avaliada antes e 1 mês após a injeção das células por meio de biópsias hepáticas. Dois meses após a terapia, os animais foram sacrificados para análise histológica dos tecidos. A fibrose foi quantificada por histomorfometria. Biópsias obtidas previamente à infusão das células mostraram intensa deposição de colágeno e a presença de septos interconectando nódulos de regeneração. Um mês após a injeção das células, esse resultado manteve-se inalterado e não havia diferenças significativas entre os grupos placebo e tratado na quantificação de fibrose. ALT e AST retornaram a valores normais 2 semanas após a infusão das células, sem diferenças significativas entre os grupos experimentais. Dois meses após a terapia, a albumina também retornou a valores normais, enquanto os resultados da histologia mantiveram-se inalterados, novamente sem diferença entre os grupos tratado e placebo. Portanto, em nossas condições experimentais, as MSC não foram capazes de reduzir fibrose ou melhorar função em um modelo animal de lesão hepática crônica.

ABSTRACT

The objective of our study was to evaluate the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) in a rat model of severe chronic liver injury. Fourteen Wistar female rats were fed exclusively an alcoholic liquid diet and received intraperitoneal injections of carbon tetrachloride every other day during 15 weeks. After this period, 8 animals (MSC group) had 1×10^7 cells injected into the portal vein while 6 animals (placebo group) received vehicle. Blood analysis was performed to evaluate alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin before and 1 and 2 months after cell or placebo infusion. Fibrosis was evaluated before and 1 month after cell or placebo injection by liver biopsies. Two months after cell delivery, animals were sacrificed and histological analysis of the livers was performed. Fibrosis was quantified by histomorphometry. Biopsies obtained before cell infusion showed intense collagen deposition and septa interconnecting regenerative nodules. One month after cell injection, this result was unaltered and differences in fibrosis quantification were not found between MSC and placebo groups. ALT and AST returned to normal values 2 weeks after cell or placebo infusion, without significant differences between experimental groups. Two months after cell or placebo injection, albumin had also returned to normal values and histological results were maintained, again without differences between MSC and placebo groups. Therefore, under our experimental conditions, MSC were unable to reduce fibrosis or improve liver function in a rat model of severe chronic liver injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|-----------|------|
| Figura 1 | p 13 |
| Figura 2 | p 14 |
| Figura 3 | p 16 |
| Figura 4 | p 17 |
| Figura 5 | p 18 |
| Figura 6 | p 20 |
| Figura 7 | p 21 |
| Figura 8 | p 25 |
| Figura 9 | p 27 |
| Figura 10 | p 35 |
| Figura 11 | p 40 |
| Figura 12 | p 52 |
| Figura 13 | p 53 |
| Figura 14 | p 54 |
| Figura 15 | p 56 |
| Figura 16 | p 57 |
| Figura 17 | p 60 |
| Figura 18 | p 61 |
| Figura 19 | p 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------|------|
| Tabela 1 | p 52 |
|----------|------|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| ^{99m} Tc: Tecnécio-99m | HGF: fator de crescimento de hepatócitos |
| ALT: alanina aminotransferase | HSC: células estreladas |
| AST: aspartato aminotransferase | KC: células de Kupffer |
| BSS: solução salina balanceada | MMP: metaloproteinases |
| CCl ₄ : tetracloreto de carbono | MSC: células mesenquimais estromais |
| CD: molécula de diferenciação celular | OMS: organização mundial da saúde |
| CMMO: células mononucleares de medula óssea | PBS: salina tamponada com fosfato |
| CMO: células de medula óssea | PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas |
| DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco | PE: ficoeritrina |
| ECM: matriz extracelular | SCF: fator de células tronco |
| EGF: fator de crescimento epitelial | SCID: imunodeficiência combinada grave |
| FAH: fumaril-acetoacetato hidrolase | SnCl ₂ : cloreto estanhoso |
| FGF: fator de crescimento de fibroblastos | TGF-β: fator de crescimento transformante β |
| FITC: isotiocianato de fluoresceína | TIMP: inibidores teciduais das metaloproteinases |
| GFP: proteína fluorescente verde | |
| HE: hematoxilina & eosina | |
| HemSC: células tronco hematopoieticas | |

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| 1. Introdução | p 12 |
| 1.1. O Fígado | p 12 |
| 1.1.1. Anatomia | p 12 |
| 1.1.2. Histologia | p 15 |
| 1.1.3. Tipos Celulares e suas Funções | p 19 |
| 1.2. Fisiopatologia da Fibrose Hepática | p 24 |
| 1.2.1. Definições | p 24 |
| 1.2.2. A Cascata Fibrogênica | p 26 |
| 1.2.3. Remodelamento Tecidual e Disfunção Hepática | p 28 |
| 1.2.4. Resolução Espontânea da Fibrose Hepática | p 30 |
| 1.3. Aspectos Epidemiológicos das Hepatopatias Crônicas | p 30 |
| 1.4. Terapia Celular | p 32 |
| 1.4.1. Plasticidade das Células de Medula Óssea | p 32 |
| 1.4.2. Terapia Celular em Modelos Animais de Hepatopatia | p 34 |
| 2. Objetivos | p 36 |
| 3. Materiais e Métodos | p 38 |
| 3.1. Animais | p 38 |
| 3.2. Modelo Experimental de Hepatopatia Crônica | p 38 |
| 3.2.1. Indução por Tetracloreto de Carbono e Álcool | p 38 |
| 3.2.2. Seleção dos animais após a indução | p 39 |
| 3.3. Análise Bioquímica | p 41 |
| 3.3.1. Coleta e Processamento das Amostras de Sangue | p 41 |
| 3.3.2. Testes Laboratoriais Utilizados | p 41 |
| 3.4. Isolamento e Cultivo das Células Mesenquimais do Estroma da Medula Óssea | p 41 |
| 3.4.1. Isolamento das Células Mononucleares de Medula Óssea | p 41 |
| 3.4.2. Obtenção das Células Mesenquimais do Estroma da Medula Óssea | p 42 |
| 3.5. Citometria de Fluxo | p 43 |

| | |
|---|-------|
| 3.6. Marcação das Células com Tecnécio-99m (^{99m} Tc) | p 44 |
| 3.7. Marcação, Injeção das Células e Obtenção das Biópsias | p 44 |
| 3.8. Histologia | p 45 |
| 3.8.1. Emblocamento em Parafina | p 45 |
| 3.8.2. Coloração por Hematoxilina e Eosina | p 46 |
| 3.8.3. Coloração por Picrosírius | p 47 |
| 3.9. Imunohistoquímica | p 47 |
| 3.10. Histomorfometria do Colágeno | p 48 |
| 3.11. Análise Estatística | p 48 |
| 4. Resultados | p 49 |
| 4.1. Perfil Bioquímico da Hepatopatia Crônica | p 49 |
| 4.2. Perfil Histológico da Hepatopatia Crônica | p 50 |
| 4.3. Depósitos Anormais de Colágeno estão Presentes no Tecido Hepático Lesado | p 51 |
| 4.4. Caracterização Fenotípica das MSC | p 51 |
| 4.5. Distribuição Sistêmica das MSC Marcadas com ^{99m} Tc após Injeção pela Veia Porta | p 55 |
| 4.6. As MSC Não Contribuem para a Melhora Funcional na Hepatopatia Crônica | p 55 |
| 4.7. As MSC Não Contribuem para a Redução da Fibrose | p 58 |
| 4.8. As MSC Não Ficam Retidas no Fígado | p 59 |
| 5. Discussão | p 62 |
| 6. Conclusões | p 71 |
| 7. Referências | p 72 |
| 8. Anexos | p 80 |
| 8.1. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Do Not Reduce Fibrosis or Improve Function in a Rat Model of Severe Chronic Liver Injury. Artigo aceito para publicação na revista Stem Cells em fevereiro de 2008. | p 80 |
| 8.2. Bone Marrow Cell Transplant Does not Prevent or Reverse Murine Liver Cirrhosis. Artigo aceito para publicação na revista Cell Transplantation em novembro de 2007. | p 111 |

8.3. Tissue Transglutaminase-2 persistence contributes p 144
to inefficient collagen degradation. Artigo submetido
para publicação na revista Brazilian Journal of Medical
and Biological Research em janeiro de 2008.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Fígado

1.1.1. Anatomia

O fígado é o maior órgão sólido do corpo humano, chegando a constituir 2 a 5% do peso corporal de um adulto (Figura 1) [1]. Localiza-se no quadrante superior direito do abdome, logo abaixo do diafragma, e é protegido pelo gradil costal [2]. Possui uma fina camada fibro-conjuntiva que o recobre, chamada de cápsula de Glisson [2]. Ele é dividido em oito segmentos, numerados em algarismos romanos, que possuem vascularização e drenagem biliar independentes (Figuras 2 e 3) [1, 2].

A chegada do sangue ao fígado se dá por dois vasos diferentes: a veia porta hepática, que leva cerca de 70% do suprimento sanguíneo, e a artéria hepática, que é um ramo da aorta, mais especificamente do tronco celíaco, e leva 30% do suprimento [2].

Por definição, a veia é um vaso que retorna o sangue ao coração. Quando encontramos um vaso de grande calibre que se interpõe entre duas redes capilares ele é chamado de porta. Esse tipo de circulação só ocorre em dois locais no organismo: no fígado e na glândula hipófise [2].

No caso do fígado, após a saída do sangue dos leitos capilares no intestino, ele é drenado pelas veias mesentéricas que, em vez de seguirem para o coração, se juntam com a veia esplênica para dar origem à veia porta hepática (Figura 4) [2]. Ela, por sua vez, chega ao fígado e se capilariza novamente, originando os sinusóides hepáticos.

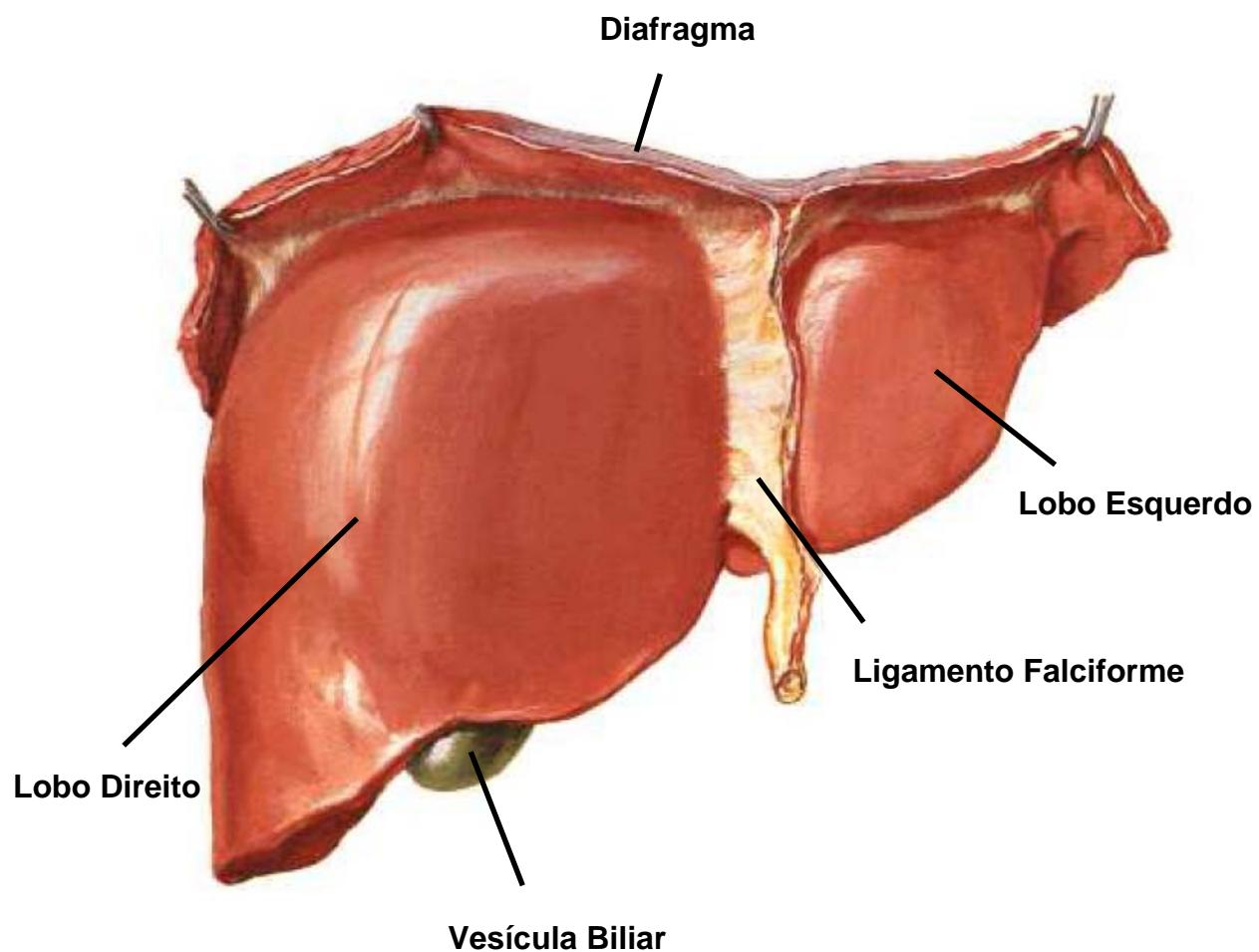


Figura 1. Esquema representativo da visão anterior do fígado humano (adaptado de Netter [3]).

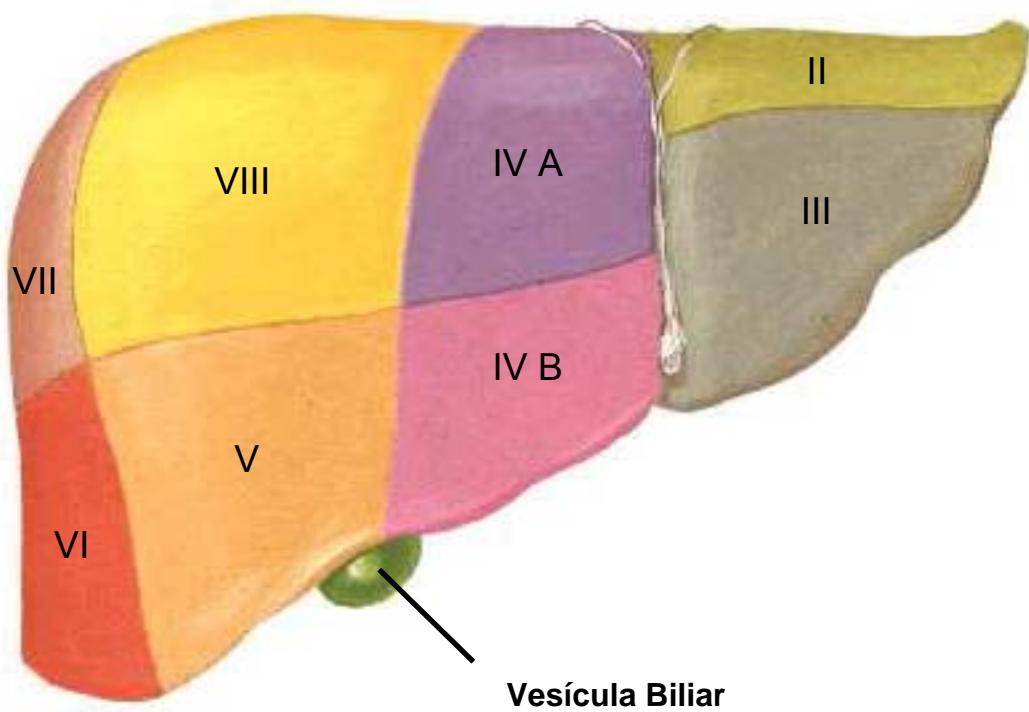


Figura 2. Esquema representativo da divisão dos segmentos hepáticos, indicados em algarismos romanos. O segmento I não é visível nesta figura pois se encontra na porção posterior do órgão (adaptado de Netter [3]).

Por fim, os sinusóides se juntam e formam as veias hepáticas, que drenam para a veia cava inferior (Figura 3) [2].

As vias biliares representam uma outra estrutura marcante do fígado. Como já mencionado, cada segmento possui uma drenagem independente. Os segmentos I, II, III, e IV se juntam e formam o ducto hepático esquerdo e os segmentos V, VI, VII e VIII formam o ducto hepático direito [2]. A junção dessas duas estruturas forma o ducto hepático comum que, por sua vez, irá se juntar ao ducto cístico para formar o ducto colédoco (Figura 5) [2]. O ducto cístico é proveniente da vesícula biliar, órgão localizado na face inferior direita do fígado e responsável pelo armazenamento da bile (Figura 5) [2].

Por fim, o ducto colédoco se junta ao ducto pancreático formando a Ampola de Vater, que deságua na segunda porção do duodeno (Figura 5) [2].

1.1.2. Histologia

Histologicamente, o fígado é formado também por estruturas muito particulares. O espaço porta é a região representada pela união entre um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um díctulo biliar, por onde ocorrerá a chegada de sangue aos hepatócitos e a coleta da bile (Figura 6) [1, 4]. A partir de cada espaço porta, surgem cordões de hepatócitos, por vezes com a espessura de uma única célula, entremeadas pelos capilares sinusóides (Figura 6) [1, 4]. Esses cordões estão dispostos radialmente e seguem em direção a outro vaso: a veia centrolobular (Figuras 6 e 7) [1, 4]. Essa veia é responsável pela drenagem do sangue que sai dos capilares sinusóides para as veias hepáticas [1, 4].

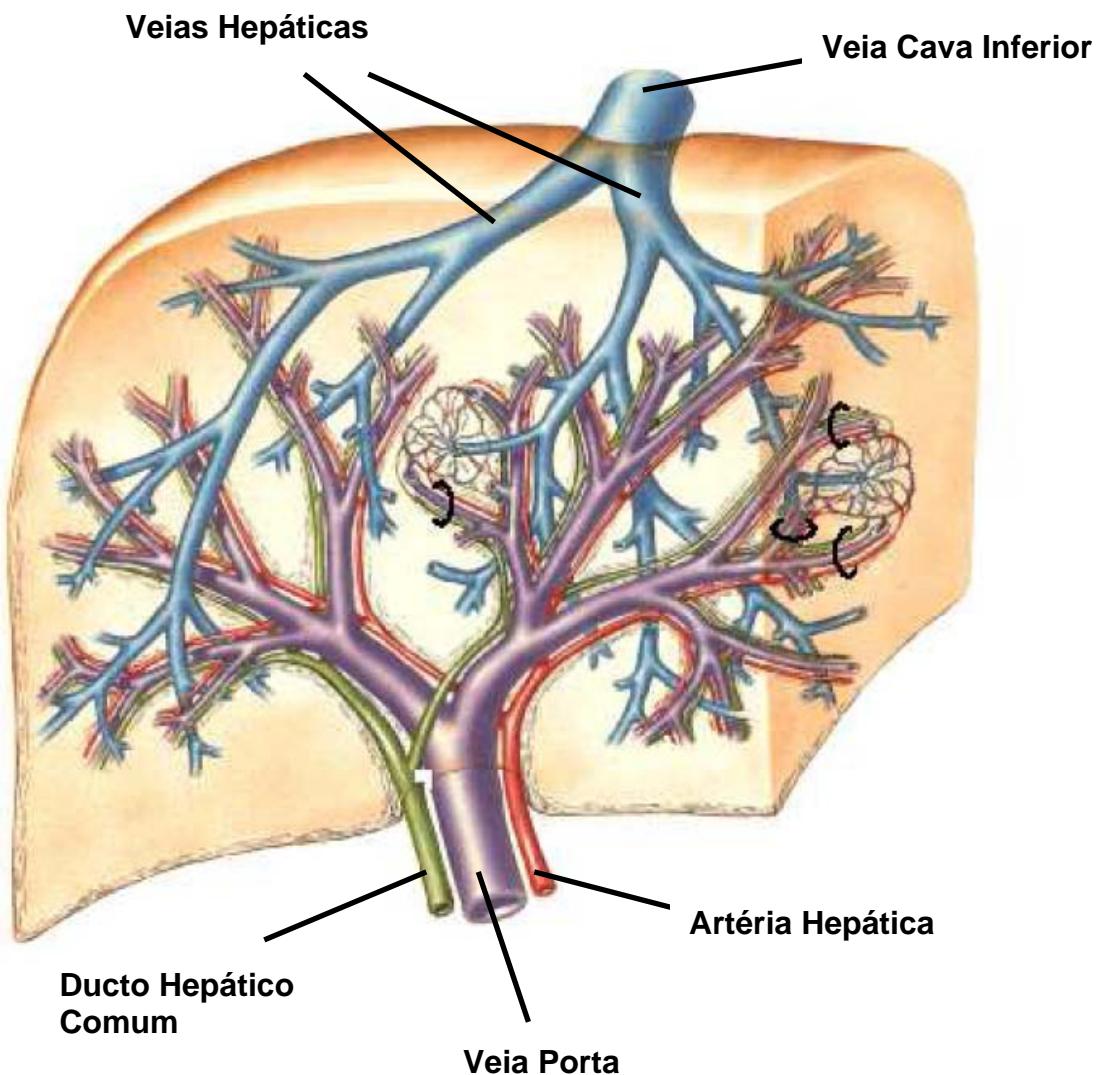


Figura 3. Esquema representativo da vascularização hepática e das vias biliares, mostrando a drenagem independente dos segmentos hepáticos (adaptado de Netter [3]).

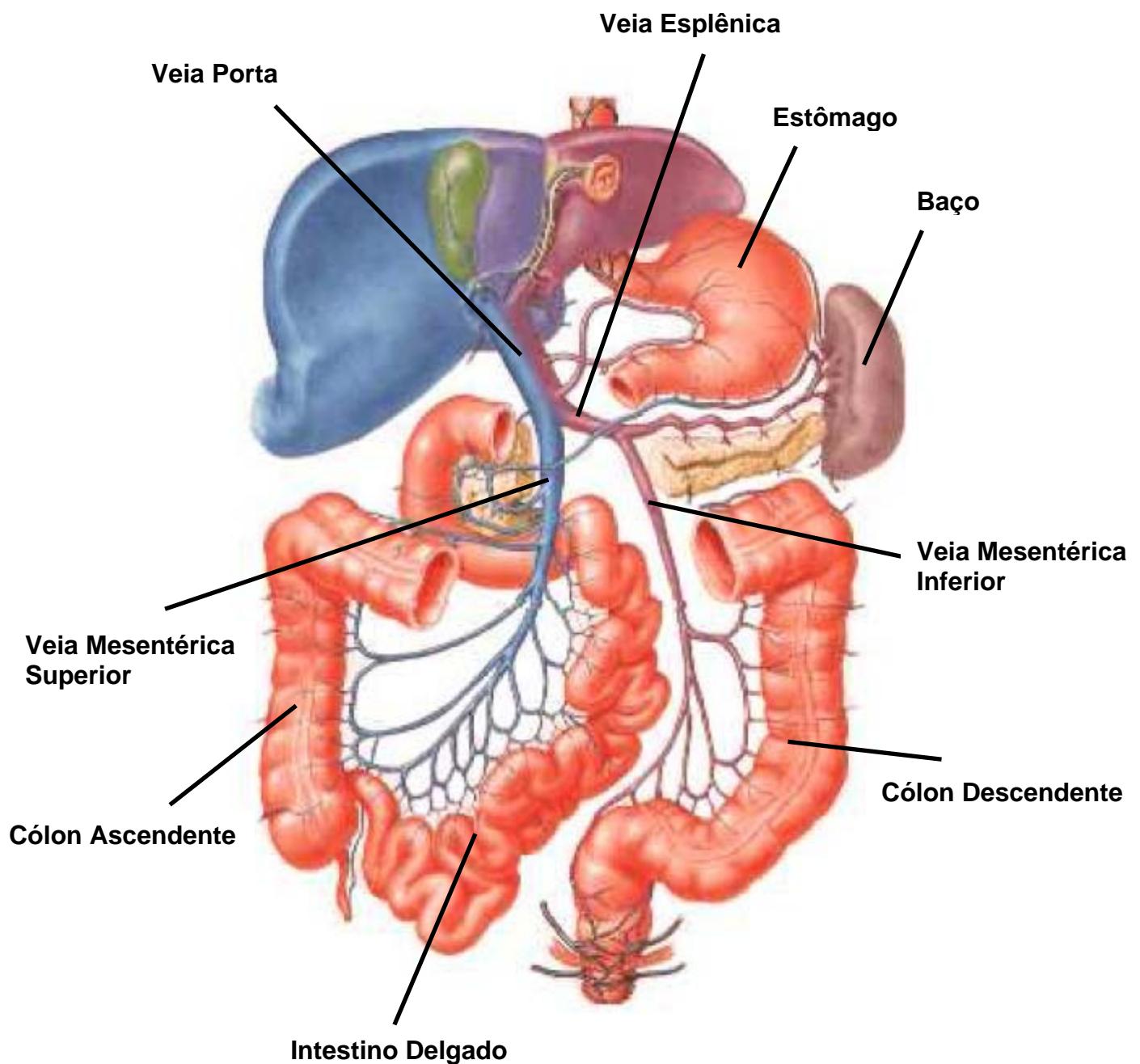


Figura 4. Esquema representativo da formação da circulação porta hepática a partir da junção das veias mesentéricas superior, inferior e esplênica (adaptado de Netter [3]).

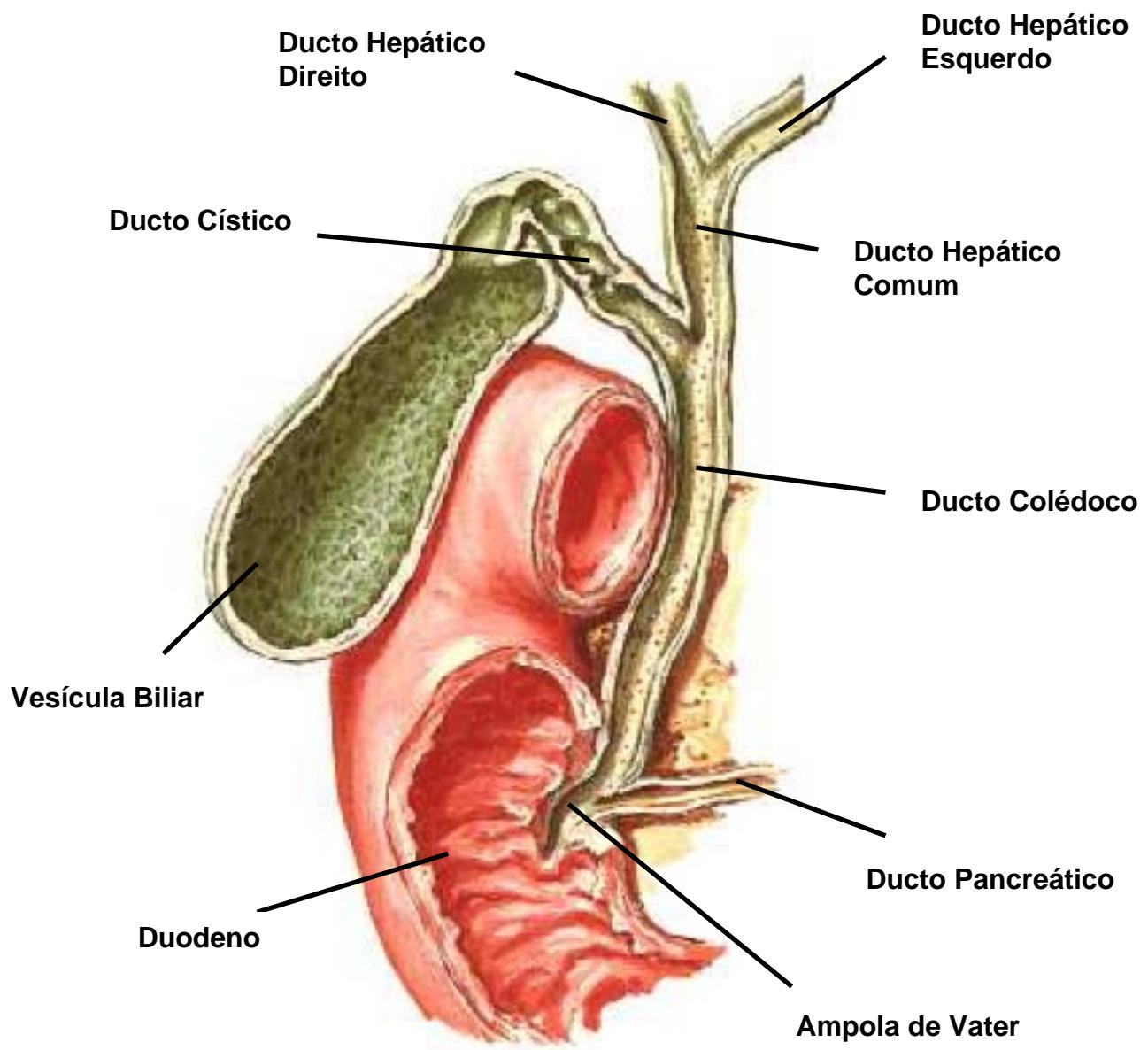


Figura 5. Esquema representativo mostrando a anatomia das vias biliares (adaptado de Netter [3]).

À estrutura hexagonal formada pela junção de 6 espaços porta ao redor de uma veia centrolobular dá-se o nome de lóbulo hepático (Figura 7) [1, 4].

Existem dois conceitos predominantes em relação à unidade estrutural e funcional do fígado: o lóbulo hepático, já mencionado, e o ácino hepático. Essa estrutura é formada pela junção entre dois lóbulos hepáticos adjacentes com duas veias centrolobulares em suas extremidades e um espaço porta no centro (Figura 7) [1, 4]. Sua organização baseia-se na intensidade de perfusão sanguínea dos hepatócitos em cada região do ácino, o que é determinado pela distância em relação à vascularização aferente, composta pelos vasos do espaço porta. Ela se divide em 3 zonas com o formato de uma elipse (Figura 7). A zona acinar 1 é a mais próxima ao espaço porta e, portanto, a mais bem perfundida. A zona 3 é a mais afastada, apresentando suprimento sanguíneo mais difícil, e a zona 2 está na região intermediária (Figura 7) [1, 4].

Por fim, uma última característica importante do fígado é a presença de uma separação entre os cordões de hepatócitos e os sinusóides hepáticos: o Espaço de Disse (Figura 8A) [1]. Sua presença permite uma troca mais prolongada e eficaz entre os hepatócitos e o sangue, o que é indispensável para que o fígado exerça adequadamente suas funções. Além disso, ele contém diversos componentes da matriz extracelular (ECM – do inglês *extracellular matrix*), como os colágenos do tipo I, III, IV e VI, fibronectina, laminina e proteoglicanos, entre outros [1].

1.1.3. Tipos Celulares e suas Funções

O fígado é responsável por múltiplas funções no organismo. A primeira delas é revelada por suas características anatômicas. Ele está interposto entre o intestino

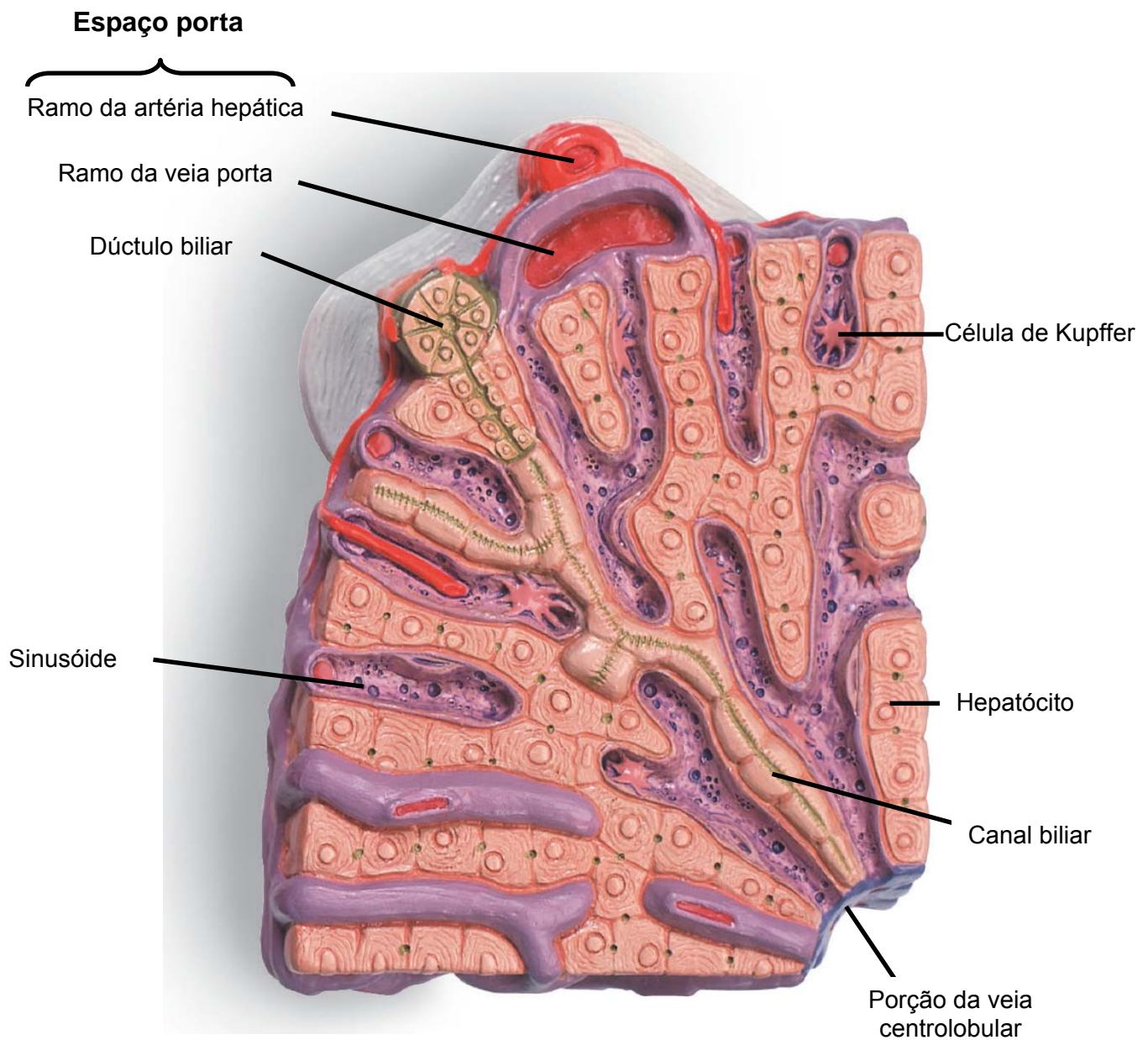


Figura 6. Esquema representativo mostrando o parênquima hepático. O sangue chega pelos vasos do espaço porta e passa para os capilares sinusóides em direção à veia centrolobular. Pequenas estruturas de cor verde entre a membrana dos hepatócitos representam os canalículos biliares, que drenam para os canais biliares em direção ao duto biliar (adaptado de 3B Scientific [5]).

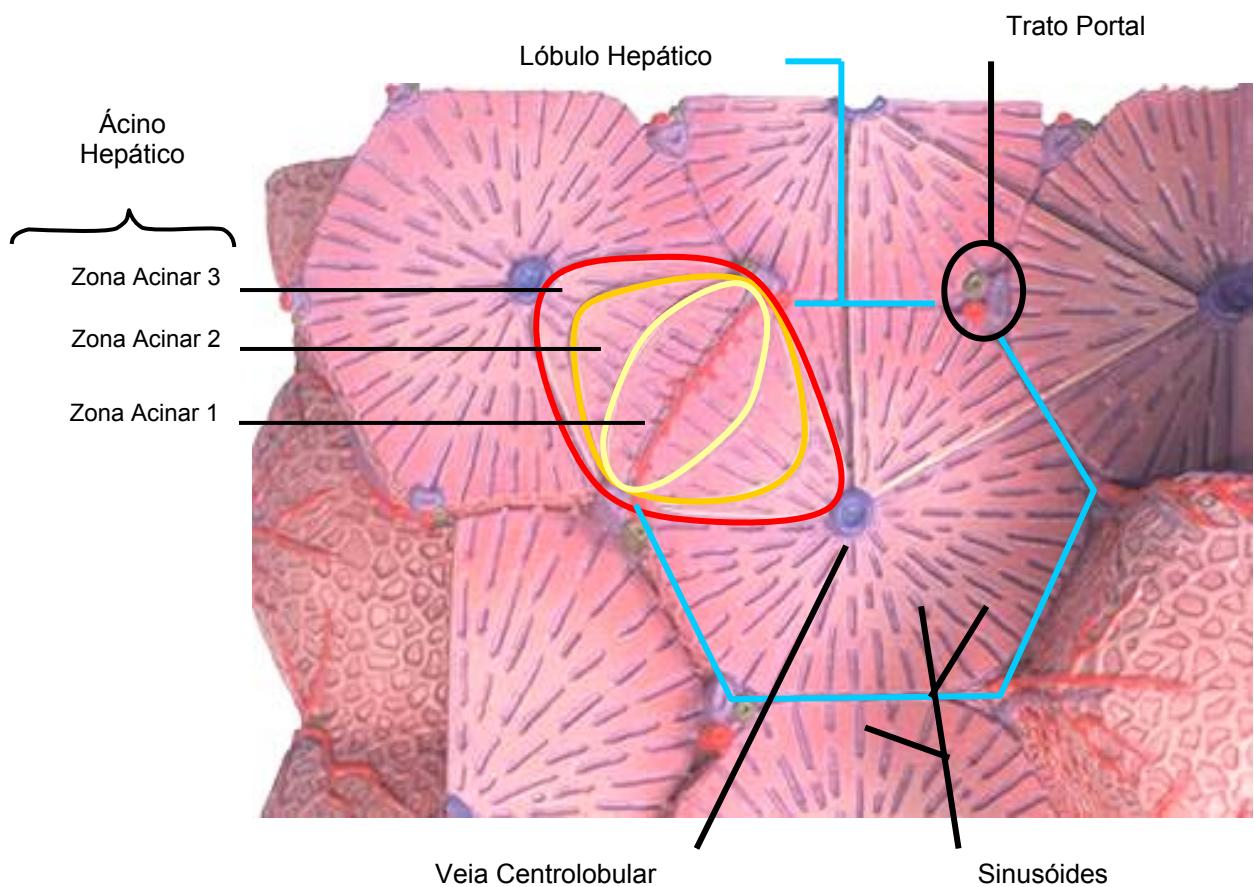


Figura 7. Esquema representativo mostrando as unidades funcionais do fígado. O lóbulo hepático (bordas azuis) é formado pela união de 6 espaços porta ao redor de uma veia centrolobular. A zona acinar 1 (bordas amarelas), zona acinar 2 (bordas laranjas) e zona acinar 3 (bordas vermelhas) formam o ácino hepático (adaptado de 3B Scientific [5]).

e o restante do corpo, funcionando como um filtro de tudo o que é absorvido. Isso explica seu duplo suprimento sanguíneo. A artéria hepática tem a função de levar oxigênio e nutrientes; a veia porta faz o transporte das substâncias absorvidas que serão processadas pelo fígado [1].

Desse modo, ele é responsável pela captação, conversão metabólica e armazenamento de aminoácidos, carboidratos e lipídeos, além de sua posterior secreção para o sangue e para bile. Também realiza biotransformação de substâncias hidrofóbicas em derivados solúveis que possam ser excretados na bile ou na urina. Outra função importante é a metabolização de substâncias tóxicas. Por fim, o fígado participa da resposta imune a patógenos [1].

O tipo celular de maior destaque presente no fígado é o hepatócito (Figura 8A). Essa célula é a responsável pela maioria das funções exercidas pelo fígado. Para tanto, ela apresenta três domínios em sua membrana celular [1, 6]. O primeiro é o domínio sinusoidal que permite o contato do hepatócito com o Espaço de Disse e, indiretamente, com a corrente sanguínea. Ele apresenta microvilosidades que aumentam a superfície de troca com o sangue (Figura 8A). Através desse domínio, o fígado exerce suas funções endócrinas secretando para o sangue albumina, fatores da coagulação e do sistema complemento, globulinas, enzimas e lipoproteínas [1]. Participa também do metabolismo energético e do controle da glicemia por efetuar a síntese, armazenamento e degradação do glicogênio, além da gliconeogênese [7]. O segundo é o domínio intercelular, que representa a área de comunicação entre os próprios hepatócitos, e o terceiro é o domínio dos canalículos biliares ou o pólo apical [6]. Este último é o local onde a bile será secretada e, portanto, representa a porção exócrina do hepatócito.

Um segundo tipo celular de grande importância no fígado são as células endoteliais sinusoidais (Figura 8A). Essas células apresentam como principais características estruturais a presença de fenestras, de aproximadamente 240 a 280 nm, e a ausência de uma lâmina basal abaixo do endotélio, o que permite a troca entre o sangue e o Espaço de Disse [8]. O tamanho dessa fenestra pode ser influenciado por hormônios, neurotransmissores e xenobióticos, como o álcool e outras drogas, aparentemente através de contrações no citoesqueleto [8].

As células de Kupffer (KC – do inglês *Kupffer cells*) são conhecidas como macrófagos hepáticos e ficam aderidas às células sinusoidais (Figura 8A). Elas são responsáveis pela remoção de endotoxinas, complexos imunes, componentes bacterianos e hemácias senescentes do sangue. Participam ativamente da resposta imune e, quando ativadas, liberam muitos produtos com efeitos biológicos potentes, incluindo proteases e citocinas inflamatórias que farão recrutamento de outras células do sistema imunológico, além de exercerem influência sobre as outras células presentes no fígado [9].

As células de Pit são linfócitos presentes no fígado com atividade *natural killer*. Como as células de Kupffer, elas também se localizam no interior dos capilares sinusóides e têm a função de defesa contra infecções virais e metástases tumorais [8].

Outro tipo celular hepático são as células estreladas (HSC – do inglês *hepatic stellate cells*). Elas se localizam no Espaço de Disse e representam o principal local de armazenamento de retinóides do organismo (Figura 8A). Além disso, atuam na manutenção da ECM através da síntese e secreção de seus componentes [10]. Na verdade, essa população passou a ser alvo de muita atenção não por suas funções

no fígado normal, mas por seu profundo envolvimento na fisiopatologia da fibrose hepática, o que será abordado na próxima seção.

Por fim, as células epiteliais dos ductos biliares, embora representem uma minoria das células do fígado, de 3 a 5%, são dotadas de importantes funções fisiológicas. Elas modificam a composição da bile produzida pelos hepatócitos através da secreção de água, proteínas e bicarbonato e pela reabsorção de glicose e glutamato [1]. Entretanto, o aspecto mais intrigante dessa população é que ela parece conter as células tronco residentes do fígado: as chamadas células ovais. Existem evidências de que essas células, normalmente encontradas nos canalículos biliares, têm a capacidade de proliferar e se diferenciar em diferentes linhagens, como hepatócitos, células epiteliais dos ductos biliares e células acinares pancreáticas [1].

1.2. Fisiopatologia da Fibrose Hepática

1.2.1. Definições

A fibrose hepática é um processo dinâmico caracterizado pelo depósito excessivo associado a uma redução da degradação dos componentes da matriz extracelular em decorrência de uma agressão crônica ao fígado [11]. Ela envolve diversos tipos celulares, citocinas e fatores de crescimento, e resulta de uma desregulação dos mecanismos homeostáticos que regulam o microambiente hepático [11]. Histologicamente, se apresenta como uma desorganização da arquitetura hepática com cicatrizes fibrosas formadas em resposta à lesão e à perda de hepatócitos (Figura 9A) [13].

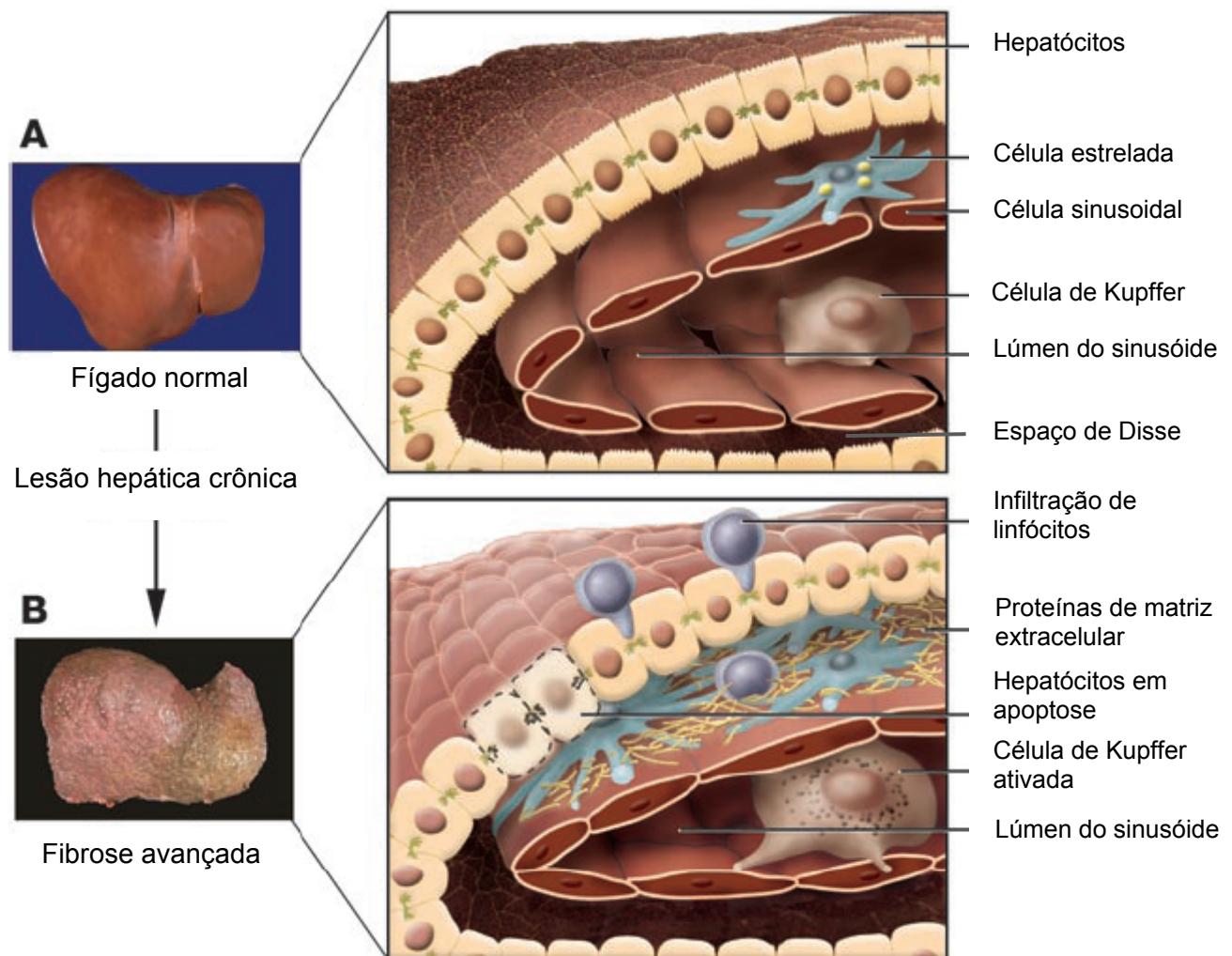


Figura 8. (A) Macroscopia do fígado normal e os diferentes tipos celulares hepáticos. Destaque para a presença de microvilosidades nos hepatócitos e de depósitos de retinóides no citoplasma da célula estrelada (em amarelo). (B) Mudanças na arquitetura hepática provocadas pela fibrose hepática avançada. A lesão hepática crônica promove a infiltração de linfócitos inflamatórios, os hepatócitos perdem suas microvilosidades e alguns entram em apoptose, e as células de Kupffer são ativadas, liberando diversos mediadores fibrogênicos. As células estreladas também são ativadas, sofrendo intensa modificação fenotípica e secretando grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular. Também ocorre a perda das fenestras da célula sinusoidal (adaptado de Bataller e Brenner [12]).

A cirrose hepática, por sua vez, é a denominação de um processo de fibrose avançado caracterizado pela formação de nódulos parenquimatosos, de tamanhos variáveis, em função do processo regenerativo e cicatricial do órgão: são os chamados nódulos de regeneração (Figura 9B) [13].

1.2.2. A Cascata Fibrogênica

Por motivos didáticos, o processo fibrogênico é dividido em seis etapas básicas: (a) ativação das HSCs, (b) migração e proliferação das HSCs, (c) síntese e deposição de componentes da ECM, (d) remodelamento tecidual, (e) contração da cicatriz, e (f) apoptose das HSCs [11]. Entretanto, esse processo é complexo e muitos tipos celulares estão envolvidos.

A ativação das HSCs e KCs ocorre em resposta à agressão do fígado. Múltiplos agentes químicos e biológicos podem induzir fibrose hepática. Embora esses agentes apresentem mecanismos diferentes para a indução de lesão celular, todos irão convergir para o mesmo processo de ativação dessas células [11].

No caso das HSCs, esse processo é dividido em dois passos básicos: o primeiro é a iniciação, no qual estímulos parácrinos enviados pelas células vizinhas que sofreram lesão, como hepatócitos [14], células endoteliais sinusoidais [16] e KCs [17], são os responsáveis por iniciar em manter a ativação das HSCs. Entre os estímulos parácrinos mais conhecidos estão o fator de crescimento transformante (TGF- β – do inglês *transforming growth factor β*), o fator de crescimento epitelial (EGF – do inglês *epidermal growth factor*) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF – do inglês *platelet-derived growth factor*) [10]. O segundo passo é a perpetuação, no qual, depois de ativadas, as HSCs sofrem uma série de

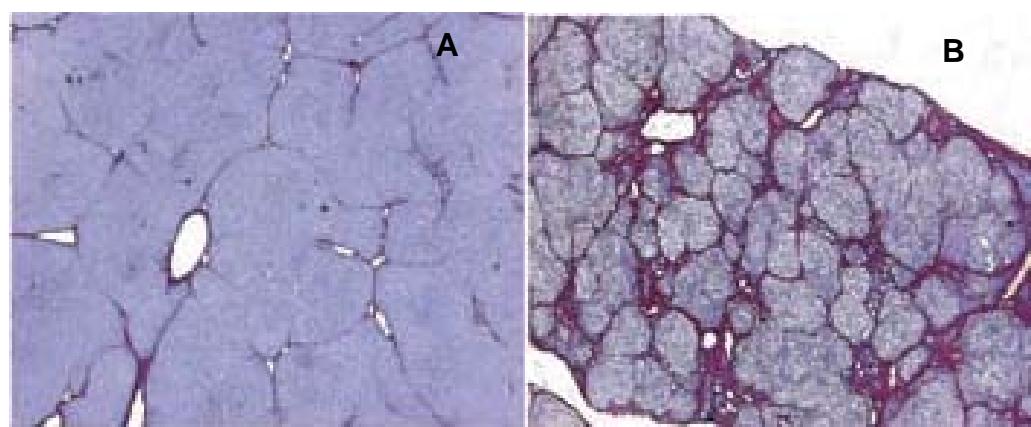


Figura 9. (A) Fibrose hepática (B) Cirrose hepática. Observar a diferença no grau de deposição dos componentes da matriz extracelular. Na fibrose, ocorrem depósitos de fibras colágenas principalmente ao redor dos vasos e sob a forma de traves finas entremeando o parênquima. Na cirrose ocorre deposição difusa de colágeno, com septos espessos que se conectam dando origem a nódulos de regeneração (adaptado de Iredale [15]).

modificações assumindo um fenótipo semelhante ao de um miofibroblasto. Elas então perdem os depósitos de retinóides, são atraídas para os locais de lesão por quimiotaxia, passam a proliferar, adquirem propriedades contráteis, promovem a fibrogênese e a liberação de citocinas inflamatórias [10].

Após a ativação, será iniciada a síntese e deposição de componentes da ECM. A principal citocina envolvida nesse processo é o TGF- β . Por estímulo desse fator ocorre aumento da síntese de componentes da ECM pelas HSCs, diminuição da expressão de metaloproteinases (MMPs), que são enzimas responsáveis pela degradação de fibras colágenas, e aumento da síntese de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) [18]. Isso resultará no desequilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, ocasionando sua deposição no fígado.

1.2.3. Remodelamento Tecidual e Disfunção Hepática

Segundo o Aurélio [19], remodelar significa: refazer com modificações profundas. Embora em termos médicos o remodelamento frequentemente indique um processo degenerativo decorrente de uma lesão, o fígado difere dos outros tecidos em sua resposta à agressão. Quando o estímulo lesivo é único e de grande intensidade, como a remoção de uma parte significativa do parênquima hepático, ocorre regeneração e a restauração completa de sua estrutura e função. Entretanto, quando o estímulo é repetitivo, de baixa intensidade e, portanto, insuficiente para iniciar uma resposta regenerativa, ocorre a formação de cicatriz [11]. Em ambas as respostas há aumento da síntese e deposição de colágeno, mas há diferenças marcantes no tipo e local de deposição das fibras. No primeiro caso, o colágeno produzido servirá para a formação de novos sinusóides e para restaurar o

microambiente hepático. Na fibrose, predomina o colágeno do tipo 1 que é responsável pela formação da cicatriz. Ele se deposita ao redor dos vasos, forma septos no parênquima e também passa a ocupar o espaço de Disse, dando origem a uma membrana basal contínua (Figura 8B) [12]. Além disso, a agressão crônica também provoca perda das microvilosidades dos hepatócitos e das fenestras dos sinusóides, ativação das KCs e o recrutamento de células inflamatórias (Figura 8B) [12].

Em condições normais, o fígado apresenta apenas pequenas quantidades de tecido conjuntivo e não possui membrana basal, proporcionando um ambiente de troca adequado entre os hepatócitos e o sangue. Com a perda das fenestras, formação da membrana basal e perda das microvilosidades em decorrência da lesão hepática crônica, haverá piora importante dos mecanismos de troca, impedindo que o órgão exerça apropriadamente suas funções [11].

Além disso, por assumirem um fenótipo de miofibroblasto, as HSCs adquirem propriedades contráteis e, por estarem aderidas às células endoteliais, podem reduzir o lúmen dos sinusóides. Isso resultará tanto no aumento da pressão na circulação porta hepática, o que tem uma série de consequências deletérias para o organismo, como na isquemia dos hepatócitos, que já tinham seu processo de troca com os sinusóides piorado pelo remodelamento tecidual. Em decorrência da isquemia, haverá morte progressiva dessas células e se instalará o quadro de insuficiência hepática, caracterizada por icterícia, ascite, distúrbios da coagulação, encefalopatia e circulação hiperdinâmica, entre outras [20].

1.2.4. Resolução Espontânea da Fibrose Hepática

Embora a fibrose avançada e a cirrose geralmente sejam consideradas processos irreversíveis até mesmo após a remoção do agente agressor, existem evidências de que uma resolução espontânea é possível [21, 22, 23]. Esse fenômeno já foi observado em pacientes com hepatites B e C crônicas após a introdução da terapia anti-viral e em uma variedade de outras doenças em que a remoção da agressão promove melhora dramática da arquitetura hepática [24]. Além disso, a análise de peças retiradas após a realização de transplante hepático também mostra evidências de que a degradação da fibrose ocorre mesmo na doença hepática avançada [25].

A ocorrência dessa resolução espontânea foi confirmada em modelos animais [15, 26, 27]. Entretanto, foi descoberto que a reversão da fibrose é apenas parcial, motivo pelo qual, embora exista melhora da arquitetura com a interrupção da agressão, a fibrose não se resolve completamente. A resolução é limitada pela formação de cross-links de colágeno mediados por uma enzima chamada transglutaminase tecidual do tipo-2. Essa enzima é capaz de estabilizar as moléculas de colágeno, dando origem aos cross-links, o que torna o colágeno resistente à degradação pelas MMPs [27].

1.3. Aspectos Epidemiológicos das Hepatopatias Crônicas

Como dito anteriormente, a cirrose hepática é definida como um processo cicatricial em resposta a uma agressão crônica que resulta na deposição de

componentes da ECM com a formação de nódulos de regeneração. Existem muitas causas possíveis para esse quadro, como hepatite auto-imune, abuso de álcool, doenças metabólicas, desordens biliares e hepatites virais [28]. Embora, os eventos desencadeantes da lesão hepática sejam diversos, todas essas doenças evoluem de forma semelhante para a cirrose.

As hepatopatias crônicas são consideradas graves problemas de saúde pública, já que atingem uma grande parcela da população mundial e causam a morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) [29]. Dentre as doenças hepáticas crônicas, a infecção pelos vírus da hepatite B e C e o consumo excessivo de álcool são as de maior relevância.

Em relação às hepatites virais, estima-se que de dois bilhões de pessoas infectadas pelo vírus da hepatite B, mais de 350 milhões poderão desenvolver hepatite crônica com alto risco de evolução para cirrose hepática e câncer de fígado [30]. A infecção pelo vírus da hepatite C tem menor incidência mundial (170 milhões), porém entre 70% a 80% dos pacientes infectados desenvolvem hepatopatias crônicas, e destes, cerca de 10% a 20% podem evoluir para a cirrose [31]. Além disso, estima-se que cerca de 32% dos casos de cirrose hepática tenham relação com o consumo excessivo de álcool [32].

No panorama brasileiro, segundo dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) [33] nos últimos 5 anos, houve mais de 1,25 milhões de internações em decorrência das doenças do fígado, ocasionando um gasto de mais de 799 milhões de reais. Além disso, quase 60 mil pessoas morreram nesse período devido a essas doenças. Portanto, esses dados demonstram a grande relevância das patologias hepáticas como causas de mortalidade e de despesas com saúde pública.

O prognóstico dos pacientes acometidos por hepatopatias crônicas não é favorável. De fato, quando o paciente acometido por alguma hepatopatia crônica evolui para cirrose hepática, o único tratamento curativo é o transplante do órgão. Embora tenham ocorrido avanços no sistema de captação de órgãos, na conscientização da população sobre a importância da doação e nas técnicas cirúrgicas que permitem o transplante de fígado intervivos, o número de órgãos doados não supre a demanda e muitos pacientes morrem durante a espera por um transplante. A taxa de mortalidade na fila de espera na cidade de São Paulo pode chegar até a 75% [34]. Por esse motivo, é necessário que novas modalidades de tratamento sejam desenvolvidas. Nesse contexto, o surgimento da pesquisa em terapias celulares abriu uma nova possibilidade no tratamento das hepatopatias crônicas.

1.4. Terapia Celular

1.4.1. Plasticidade das Células de Medula Óssea

A medula óssea é o órgão responsável pela produção de todas as células sanguíneas (Figura 10). Essas células, por sua vez, têm a função de carrear oxigênio e oferecer proteção imunológica, entre outras, para todas as outras células do organismo. Por terem uma vida relativamente curta, é necessário que elas sejam constantemente renovadas. Para tanto, a medula óssea chega a produzir 100 bilhões de novas células sanguíneas por dia [35].

Essa noção da capacidade de renovação das células do sangue não é nova. De fato, médicos e pesquisadores já a conhecem há mais de 50 anos. A primeira evidência surgiu em 1945, após o lançamento das bombas de Hiroshima e

Nagasaki, quando se iniciaram os estudos com pessoas expostas a doses letais de radiação. A partir de então, cientistas descobriram que podiam resgatar camundongos irradiados da morte com o uso de transplantes de medula. Na década de 60, pesquisadores passaram a analisar a medula para descobrir qual componente seria responsável pela regeneração do sangue. Foram descritas, então, as células tronco hematopoiéticas (HemSC – do inglês *hematopoietic stem cells*) e suas características: capacidade de auto-renovação e de dar origem a todos os tipos diferentes de células sanguíneas [35].

Entretanto, apenas recentemente passou-se a considerar que essas células tronco poderiam ter maior plasticidade. Esse termo se refere à capacidade de gerar células especializadas de outros tecidos diferentes daquele em que a célula tronco reside – sejam eles da mesma ou de diferentes origens embrionárias (endoderma, mesoderma e ectoderma) [35]. A demonstração desta maior plasticidade das células tronco de medula óssea surgiu no contexto da utilização dessas células no tratamento de doenças. Em 1998, foi publicado um trabalho mostrando que células de medula óssea transplantadas em camundongos eram capazes de migrar e se diferenciar em miócitos, contribuindo para a regeneração de lesões no músculo esquelético [36].

A partir desse ponto, inúmeros artigos foram publicados demonstrando que essas células poderiam dar origem a cardiomiócitos [37, 38], neurônios [39, 40], hepatócitos [41, 42], células do pulmão, rim, pele e intestino [43], e do pâncreas [44]; gerando uma enorme expectativa pela possibilidade de utilizá-las no tratamento de doenças degenerativas.

Além das células tronco hematopoiéticas, que dão origem a todas as células do sangue, a medula óssea contém pelo menos mais um tipo de célula que

apresenta plasticidade: a célula mesenquimal estromal (MSC – do inglês *mesenchymal stromal cell*) (Figura 10). Essa célula é responsável pela formação do tecido de sustentação da medula e como características principais apresenta: capacidade de formar ossos, cartilagens, músculos, tecido adiposo, tendões e ligamentos [45]; fácil obtenção e manejo; e alto potencial de expansão *in vitro* [46]; todas características atraentes para o uso clínico.

Além disso, já foi amplamente demonstrado que essas células podem se diferenciar em diversos tipos celulares, como cardiomiócitos [47, 48], neurônios [49] e hepatócitos [50, 51, 52, 53].

1.4.2. Terapia Celular em Modelos Animais de Hepatopatia

Já existem alguns trabalhos publicados que utilizaram células da medula óssea em modelos animais de hepatopatias [54, 55, 56, 57, 58]. Diversas populações de células derivadas da medula, como as mononucleares, hematopoiéticas e mesenquimais, foram testadas em modelos experimentais também bastante diversos. Por esse motivo, os resultados da terapia ainda são controversos, bem como sua real importância no tratamento das hepatopatias crônicas.

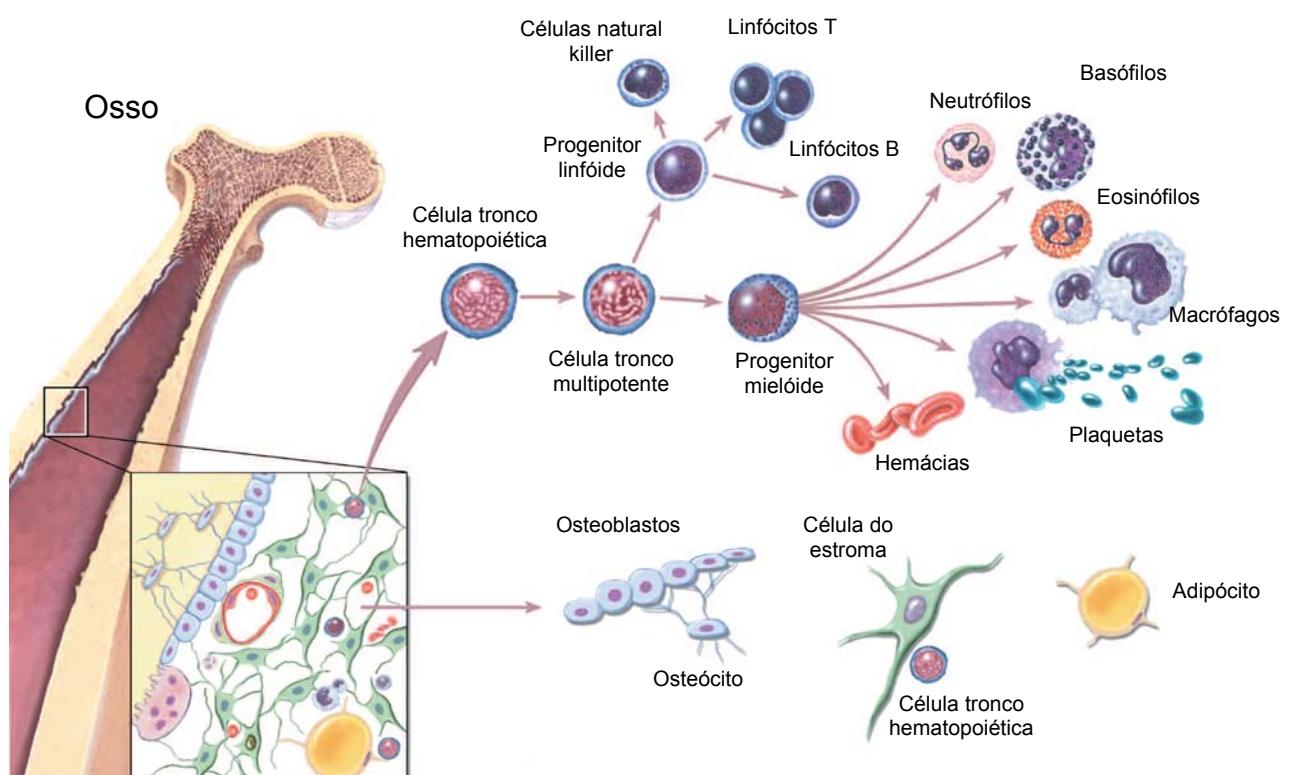


Figura 10. Diferenciação das células hematopoieticas e das células estromais (adaptado de Domen [35]).

2. OBJETIVOS

Através de um modelo experimental de cirrose hepática em ratos Wistar já estabelecido por nosso grupo [59], a pesquisa enfocará o estudo do potencial terapêutico das MSC na recuperação da cirrose. O modelo de cirrose experimental se baseia na associação entre o tetracloreto de carbono (CCl_4), um agente hepatotóxico conhecido [60], e o álcool, administrado como componente de uma dieta líquida balanceada. A associação entre álcool e CCl_4 já foi descrita como sendo sinérgica na indução de lesão hepática, além de proporcionar uma menor mortalidade dos animais durante a indução da cirrose [61].

A injeção das células será pela veia porta hepática e a análise dos resultados será feita através de parâmetros de bioquímica do sangue, histologia e imunohistoquímica, o que nos permitirá avaliar os aspectos funcionais e morfológicos do tratamento com MSC. Todos esses parâmetros serão avaliados ao final da indução da cirrose, bem como 1 e 2 meses após a injeção das células.

O objetivo geral do trabalho é:

- Avaliar o impacto da administração de células mesenquimais estromais da medula óssea na presença de disfunção hepática decorrente da agressão crônica.

Mais especificamente, temos como objetivos:

- Analisar e quantificar o grau de fibrose no fígado cirrótico antes e após a infusão das células mesenquimais estromais da medula óssea.
- Caracterizar o fenótipo das células mesenquimais estromais da medula óssea por citometria de fluxo.

- Verificar o aporte das células mesenquimais estromais da medula óssea ao fígado após a injeção através de cintilografia com Tecnécio-99m.
- Investigar a permanência das células mesenquimais estromais da medula óssea no tecido hepático.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Todo o experimento foi executado de acordo com as normas do Guia de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (DHHS Publicação No. (NIH) 85-23, revisado em 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892).

Foram utilizados ratas da cepa Wistar obtidas no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF). Elas foram mantidos em biotério com temperatura controlada (23°C) e exposição diária a um ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas.

3.2. Modelo Experimental de Hepatopatia Crônica

3.2.1. Indução por Tetracloreto de Carbono e Álcool

A cirrose hepática foi induzida em 50 animais com peso entre 200 – 220g através de injeções intraperitoneais de uma solução a 20% de tetracloreto de carbono (CCl_4) (VETEC, Lote 0505638, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) diluído em azeite (0,05mL/kg) associado a uma dieta alcoólica líquida de acordo com as orientações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93) [62]. Essa dieta era administrada de forma exclusiva, de modo que os animais não recebiam qualquer tipo de alimento ou água durante o período de indução. Previamente à administração do CCl_4 , os animais eram submetidos a uma fase de adaptação com uma dieta não-alcoólica (dieta controle) administrada por uma semana seguida de uma segunda semana de adaptação à dieta líquida alcoólica. Após essas duas semanas, era iniciada a

injeção intraperitoneal de CCl₄ 3 vezes por semana, mantida ao longo 15 semanas (Figura 11).

A dieta controle tinha composição idêntica à da dieta alcoólica, exceto pelo álcool que era substituído pelo mesmo volume de água. Os animais tinham acesso *ad libitum* às dietas líquidas.

3.2.2. Seleção dos animais após a indução

Após 15 semanas de agressão, todos os ratos foram submetidos a exames de sangue para avaliar o grau de lesão e função hepáticas. Amostras obtidas de 10 animais normais, chamados de controle, foram usadas para definir a faixa normal de valores para cada um dos parâmetros analisados. Esse cálculo foi feito utilizando a média \pm 2 desvios-padrão para cada um dos testes. Especificamente, a faixa de valores utilizados foi: alanina aminotransferase (ALT) 34,02 – 44,34 U/L, aspartato aminotransferase (AST) 80,50 – 95,90 U/L, and albumina 3,075 – 3,306 g/dL.

Apenas aqueles animais que apresentassem valores fora da faixa de valores normais pré-definidos nos três parâmetros bioquímicos analisados foram incluídos no estudo. Esses animais foram divididos em dois grupos: tratado e placebo. O grupo tratado recebeu a injeção de 1×10^7 MSC diluídas em 0,5mL de solução salina balanceada (BSS) pela veia porta. O grupo placebo foi submetido ao mesmo protocolo, porém recebeu injeção somente de BSS.

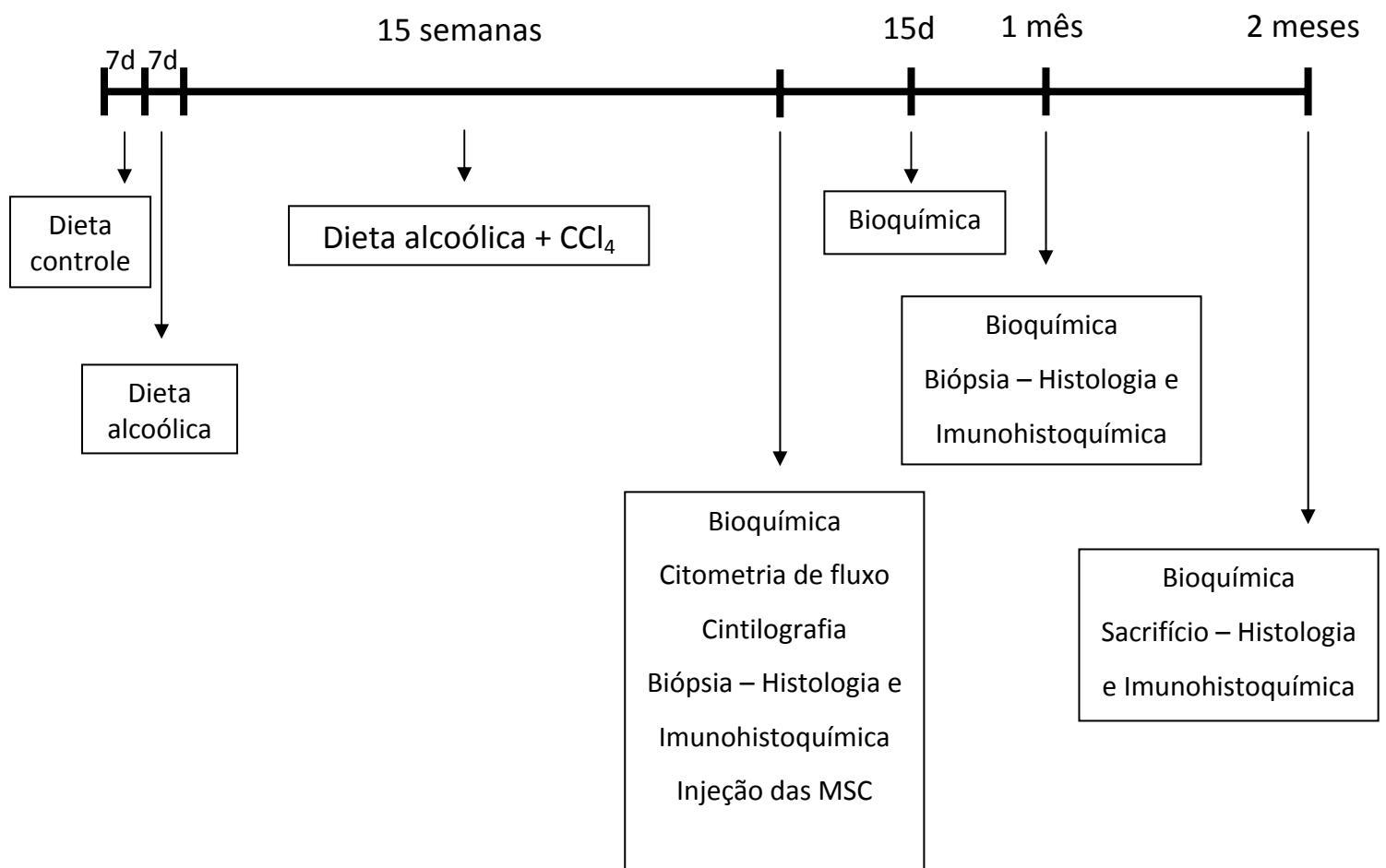


Figura 11. Representação do curso temporal do modelo experimental e da análise dos resultados.

3.3. Análise Bioquímica

3.3.1. Coleta e Processamento das Amostras de Sangue

Os animais foram anestesiados com éter por via inalatória e a coleta de sangue foi realizada através de punção da artéria da cauda. A quantidade de sangue retirada era de 1 mL aproximadamente. As amostras de sangue eram centrifugadas a 3584 x g por 10 minutos, o soro era coletado e mantido a 4°C. As amostras eram levadas para a realização dos testes no mesmo dia da coleta.

3.3.2. Testes Laboratoriais Utilizados

Os parâmetros bioquímicos analisados foram AST (método UV-IFCC), ALT (método UV-IFCC) e albumina (método Verde de Bromocresol). As amostras foram analisadas com o aparelho Bio 200F (BioPlus, São Paulo, SP, Brasil). A coleta foi realizada após o término das 15 semanas de indução e 15 dias, 1 e 2 meses após a injeção das MSC.

3.4. Isolamento e Cultivo das Células Mesenquimais do Estroma da Medula Óssea

3.4.1. Isolamento das Células Mononucleares de Medula Óssea

As células de medula óssea foram obtidas a partir do fêmur e tíbia de ratos Wistar isogênicos. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura estéreis a pele e os

músculos adjacentes ao fêmur e à tíbia foram retirados, sempre evitando o rompimento de vasos sanguíneos presentes na região. As epífises ósseas foram cortadas e a cavidade medular lavada com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) utilizando uma seringa com agulha colocada sobre um tubo estéril de poliestireno cônico de 15 mL. As células foram homogeneizadas com auxílio de pipeta Pasteur e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspendido em DMEM sem soro, e em seguida adicionado cuidadosamente sobre o Ficoll (Histopaque 1083, 1:1, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A seguir, as células foram centrifugadas a 400 x g durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anel de células, formado na interface Ficoll – meio de cultura, foi coletado e colocado em um tubo de poliestireno cônico de 15 ml. Este anel de células contém células mononucleares de medula óssea (CMMO). As células foram ressuspendidas em BSS e centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e este processo repetido mais duas vezes para retirar o Ficoll que pudesse ter sido coletado junto com o anel de células. A seguir as células foram contadas e a sua viabilidade analisada com azul de Trypan.

3.4.2. Obtenção das células Mesenquimais do Estroma da Medula Óssea

As MSC foram obtidas através do plaqueamento das células mononucleares separadas pelo processo descrito acima. O plaqueamento foi feito na densidade de 1×10^8 células em frascos de poliestireno de 75 cm^2 contendo DMEM acrescido de

20% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT, USA), suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL – Gibco). As células foram mantidas à 37°C em estufa com atmosfera úmida em presença de 5% de CO₂. Após 4 dias, o meio de cultura era trocado e todas as células não aderentes eram descartadas. Quando as MSC alcançavam 80% de confluência, elas eram removidas dos frascos de poliestireno através da adição de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich). As células eram centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente e o sedimento de células era mais uma vez plaqueado em duas garrafas diferentes. Esse procedimento foi repetido até a sétima passagem para a expansão da população de células.

3.5. Citometria de Fluxo

Uma amostra das MSC obtida pelos procedimentos de cultura descritos acima foi utilizada para analisar o fenótipo das células por citometria de fluxo. A marcação foi feita em 3×10^5 células a 4°C durante 20 minutos ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados para marcação foram: anti-CD34-phycoerythrin (PE) (ICO 115, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD11b-FITC (ambos do Caltag Laboratories – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-CD90-PE e anti-CD29-FITC (ambos da BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Após marcação as células foram lavadas duas vezes com salina antes da realização da citometria de fluxo (BD FACSaria, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Todos os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:100.

3.6. Marcação das Células com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

Dez milhões (1×10^7) de células foram marcadas com ^{99m}Tc e injetadas em um grupo separado de animais não incluídos nos grupos experimentais [63]. Quinhentos microlitros de uma solução de cloreto estanhoso (SnCl_2) foram adicionados a uma suspensão de soro fisiológico contendo as células. Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 45 mCi de ^{99m}Tc foram adicionados e mantidos por mais 10 minutos. A mistura foi então centrifugada a 500 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com solução salina. A viabilidade foi avaliada, a seguir, através do teste com azul de Trypan. A eficiência da marcação foi calculada pela radioatividade no *pellet* de células dividida pela soma da radioatividade no *pellet* mais a radioatividade do sobrenadante. Seis horas após a injeção, imagens de corpo inteiro foram capturadas para a análise qualitativa da distribuição utilizando uma gama câmera (GE Integra, General Electronics, Fairfield, CT, USA) equipada com um colimador de alta resolução. Utilizamos uma janela de energia de 20% centrada no pico de foto de 144keV do ^{99m}Tc .

3.7. Marcação, Injeção das Células e Obtenção das Biópsias

Após a sétima passagem, as células foram removidas dos frascos de cultura e incubadas com Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos com o objetivo de marcá-las para verificar sua incorporação ao fígado após a injeção. Em seguida,

foram realizadas duas lavagens com BSS para remover o Hoescht 33342 que não tinha se ligado às células. Por fim, 1×10^7 células foram diluídas em 0.5 mL de BSS e injetadas na veia porta de cada rato.

Os animais foram anestesiados com 50 μ L/100g de quetamina e 100 μ L/100g de xilazina por via intraperitoneal, foi feita uma incisão vertical mediana de 3 cm no abdome e a cavidade foi exposta. O fígado foi pinçado e um fragmento de fígado de 5mm³ foi cortado com uma tesoura. O pinçamento foi mantido por mais alguns segundos e, a seguir, o local foi comprimido com gaze até que o sangramento parasse. Então, a veia porta foi isolada das estruturas adjacentes e as MSC injetadas diretamente na circulação. Após a injeção, o vaso também foi comprimido com gaze até que o sangramento parasse. Em seguida, 1mL de soro fisiológico era administrado na cavidade abdominal para reposição volêmica. A parede abdominal era suturada em duas camadas com pontos contínuos. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

3.8. Histologia

A análise histológica foi realizada 15 semanas após a indução da cirrose e 1 e 2 meses após a injeção das células, avaliando as diferenças entre os controles que receberam apenas veículo e animais tratados com MSC.

3.8.1. Emblocamento em Parafina

Os fragmentos de fígado obtidos na biópsia ou a partir do órgão de cada animal sacrificado foram lavados em salina tamponada com fosfato (PBS – do inglês

phosphate buffered saline) até que o excesso de sangue e coágulos fosse removido.

Em seguida, foram fixados por 5h em solução de Gendre. Logo após, os fragmentos foram fixados por 24h em solução tamponada de formaldeído a 10%.

Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70% e 2 vezes em 100%) por 30 minutos em cada banho. Logo em seguida, foram colocadas em dois banhos de xilol puro por 15 minutos. A infiltração foi feita em três banhos de parafina a 60°C por 30 minutos. Posteriormente, os blocos das amostras foram seccionados em micrótomo histológico, obtendo-se cortes de 5µm de espessura.

3.8.2. Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE)

Para promover a desparafinização dos cortes, as lâminas foram incubadas em estufa a 60°C por 20 minutos. Em seguida, foram feitos três banhos sucessivos de xilol PA por 3 minutos. Os cortes foram hidratados em banhos de concentrações decrescentes de álcool (álcool 100%, 95%, e 90%) por 3 minutos e, a seguir, foram lavados em água destilada por 3 minutos. As lâminas foram incubadas em solução de Hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavados em água corrente também por 10 minutos. Então, as lâminas foram incubadas em solução de Eosina por 10 minutos e, logo após, foram lavadas rapidamente em água corrente. Os cortes foram desidratados em soluções crescentes de álcool (álcool 95%, 95%, 100% e 100%) por 3 minutos em cada solução e a clarificação foi feita em 3 banhos de xilol de 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com Entellan.

3.8.3. Coloração por Picrosírius

As lâminas emblocadas em parafina foram colocadas na estufa a 60°C durante 40 minutos para facilitar a retirada da parafina. Os cortes histológicos foram submetidos a três banhos de xanol PA por 5 minutos. O material foi hidratado através de banhos de 5 minutos em soluções decrescentes de álcool (100%, 95%, 90% e 70%) e depois lavados em água destilada por 10 minutos. As lâminas foram incubadas em solução de ácido fosfomolíbdico 0,2% por 1 minuto e, em seguida, em solução de picrosírius por 90 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em ácido clorídrico 0,01N por 2 minutos e em álcool 70% durante 45 segundos. O material foi desidratado com duas lavagens sucessivas de 5 minutos em álcool 95% e 100%. Os cortes foram clarificados através de duas lavagens com xanol por 5 minutos. As lâminas foram montadas com Entellan.

3.9. Imunohistoquímica

Amostras de tecido foram obtidas após 15 semanas de indução e 1 e 2 meses após a injeção das células. Essas amostras foram submetidas a um gradiente de sacarose, primeiro a 10%, depois a 30%, embebidas no composto criopreservador Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda) e conservadas em -70°C. Cortes de 8 µm de espessura foram obtidos no criostato (Leica CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -20°C e fixados em acetona a 4°C. Foi utilizada a técnica de imunohistoquímica indireta para revelar o colágeno tipo I (1:30, Chemicon – Millipore, Billerica, MA, USA). O anticorpo secundário foi FITC anti-coelho IgG (H+L) conjugado (1:50, Zymed – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.10. Histomorfometria do Colágeno

A histomorfometria do colágeno foi realizada utilizando um sistema de imagem composto por uma câmera digital Q-color® (Olympus, Japão) acoplado a um microscópio de epifluorescência Axiovert 100 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Foram fotografados campos aleatórios dos cortes de cada animal usando uma lente objetiva com aumento de 4X. Em todos os casos, toda a área de tecido disponível no corte era analisada, porém a quantidade de campos utilizados era variável. Caso a amostra fosse proveniente de uma biópsia, a análise era feita em 2 a 3 campos por animal aproximadamente. Após o sacrifício dos animais, a disponibilidade de tecido era maior, permitindo a avaliação de 5 a 6 campos por animal. A quantificação do colágeno foi estimada pelo percentual da área marcada em vermelho em relação à área total dos campos examinados utilizando o software Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

3.11. Análise Estatística

Os dados foram analisados usando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey e o teste-t não-pareado. P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os dados estão apresentados como média ± SE.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil Bioquímico da Hepatopatia Crônica

Ocorreram 3 óbitos ao longo das 15 semanas de indução de lesão hepática crônica. Os 47 animais restantes tiveram amostras de sangue colhidas ao final da indução para dosagem de ALT, AST e albumina. Já é amplamente conhecido o fato de que os modelos experimentais de fibrose hepática têm um grande problema: o grau de fibrose em cada animal é altamente heterogêneo [15, 26, 27]. Enquanto alguns animais mostram intensa deposição de componentes da ECM, e comprometimento da função hepática, outros são apenas levemente acometidos. Por esse motivo, apenas aqueles animais que apresentaram valores fora da faixa de valores normais pré-definidos nos três parâmetros bioquímicos analisados foram incluídos no estudo.

A AST e a ALT são enzimas que existem normalmente no interior dos hepatócitos. Mediante agressão e destruição celular, essas enzimas são liberadas para a corrente sanguínea, de modo que seu valor deverá estar aumentado no sangue dos animais submetidos à indução de lesão hepática. A albumina é uma proteína produzida exclusivamente pelo fígado, de modo que a destruição do parênquima e o prejuízo da função hepática ocasionarão queda nos valores séricos dessa proteína.

Quatorze animais apresentaram resultados alterados nesses três parâmetros e foram selecionados para a terapia celular. A figura 12 mostra a comparação entre esses animais e ratos controles de mesma idade na época da coleta dos exames. Na tabela 1 é mostrada a distribuição dos 33 animais restantes em relação à quantidade de parâmetros bioquímicos alterados encontrados.

4.2. Perfil Histológico da Hepatopatia Crônica

O fígado normal apresenta camadas de hepatócitos radialmente dispostos alinhados com os sinusóides e convergindo em direção às veias centrolobulares (Figura 13A). Além disso, a deposição de colágeno ocorre apenas ao redor dos vasos (Figura 13H).

As biópsias obtidas durante a cirurgia para injeção das MSC ou de placebo mostraram características semelhantes em todos os 14 animais: perda da arquitetura hepática normal e um infiltrado linfocítico crônico moderado a intenso predominantemente localizado nos espaços porta e nos septos fibrosos (Figura 13B e E). A coloração com picrosírius mostrou a formação de nódulos de regeneração conectados por septos de colágeno espessos (Figura 13I e L). Embora o grau de desorganização histológica fosse diferente, todos os animais desenvolveram fibrose avançada.

Um mês após a terapia celular, novas biópsias foram obtidas. A coloração com HE mostrou redução marcante do infiltrado inflamatório nos grupos placebo (Figura 13C) e tratado (Figura 13F). A deposição de colágeno era comparável à encontrada no momento da injeção de placebo (Figura 13J) ou das células (Figura 13M).

Dois meses após a terapia, todos os animais foram sacrificados. O infiltrado inflamatório foi raramente encontrado (Figura 13D e G), porém a deposição de colágeno ainda estava presente, embora em quantidade aparentemente menor nos dois grupos experimentais (Figura 13K e N).

4.3. Depósitos Anormais de Colágeno estão Presentes no Tecido Hepático Lesado

Utilizamos a imunofluorescência indireta para confirmar a presença de depósitos de colágeno do tipo I no fígado. Essa proteína é produzida em grandes quantidades pelas células estreladas ativadas. Nos animais controles, o colágeno I é encontrado apenas ao redor dos vasos e como pequenas fibrilas no parênquima (Figura 14A). Após a indução de lesão hepática crônica, ocorre deposição de colágeno do tipo I com formação de nódulos de regeneração (Figura 14B). As figuras 14C e 14D mostram, respectivamente, a deposição de colágeno do tipo I um e dois meses após a infusão das células.

4.4. Caracterização Fenotípica das MSC

De acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular (SITC), os critérios para definição das MSC são aderência ao plástico, expressão de抗ígenos de superfície específicos e multipotencialidade [64].

Nossas células, purificadas pela aderência aos frascos plásticos utilizados na cultura, apresentavam uma morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 15A). Noventa e sete porcento dessas células eram positivas para CD90, 92% expressavam CD29, enquanto que a expressão de CD34, CD45 e CD11b era negativa (Figura 15). Esses achados estão de acordo com os critérios estabelecidos pela SITC [64].

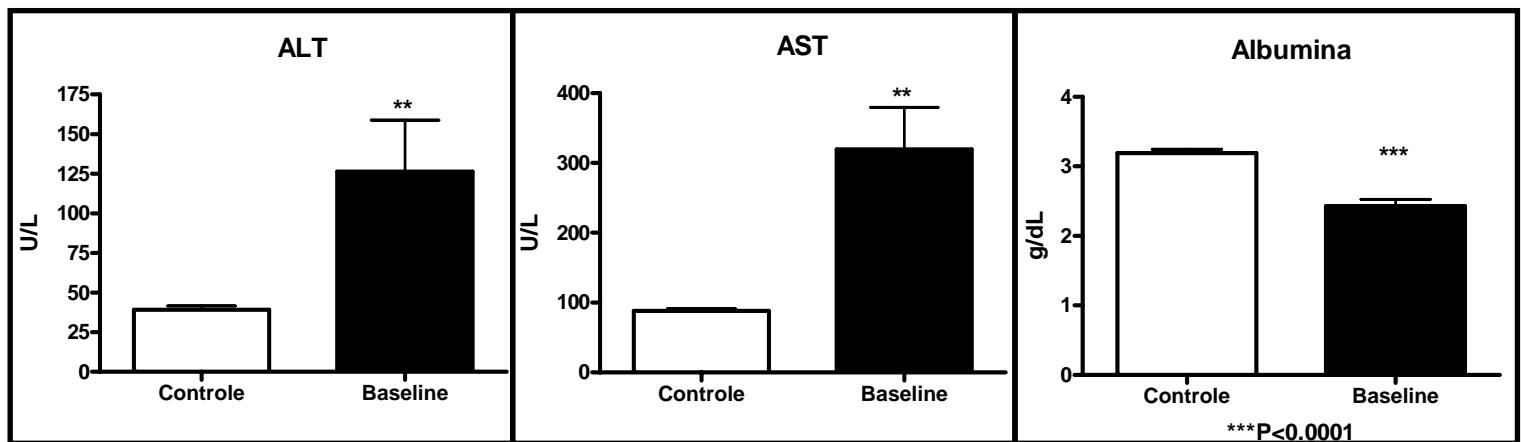


Figura 12. Marcadores bioquímicos de hepatopatia crônica. ALT e AST encontram-se significativamente elevadas em comparação aos animais controle após 15 semanas de indução (ALT Controle $39,18 \pm 2,48$; Baseline $126,4 \pm 32,48$; **P=0,0019; AST Controle $88,20 \pm 3,40$; Baseline $319,5 \pm 60,28$; **P=0,0017). A albumina encontra-se significativamente diminuída em relação aos controles após 15 semanas de indução (Controle $3,190 \pm 0,055$; Baseline $2,469 \pm 0,109$; ***P<0,0001) (Controle n=10; Baseline n=14).

Tabela 1 – Distribuição dos animais de acordo com o número de parâmetros bioquímicos alterados após 15 semanas de agressão ao fígado

| Número de parâmetros alterados | 0 | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------------|----|----|----|----|
| Percentual | 11 | 23 | 34 | 32 |

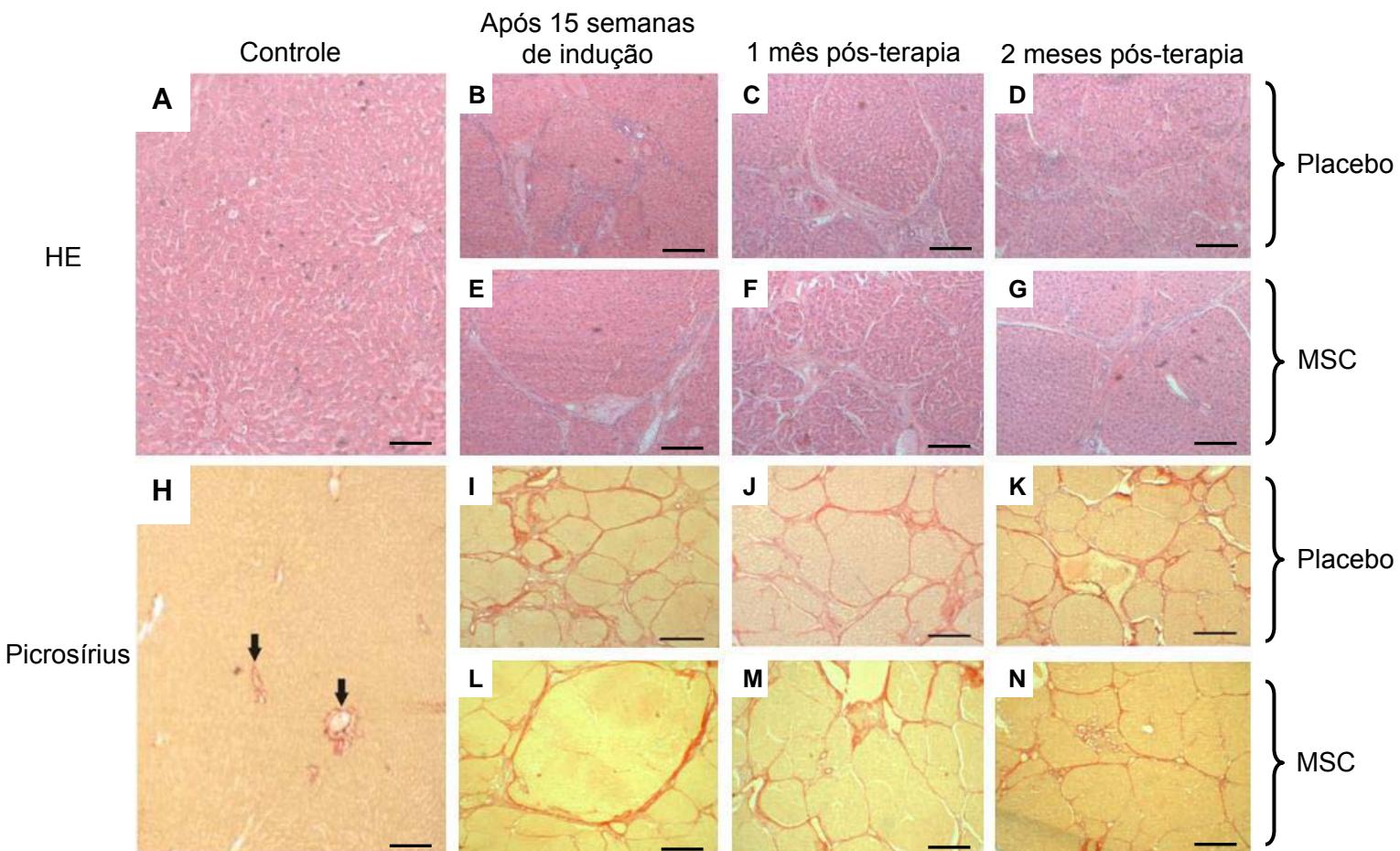


Figura 13. Imagens representativas mostrando os achados microscópicos da hepatopatia crônica. (A) Fígado normal: hepatócitos dispostos radialmente alinhados com os sinusóides. (B e E) Infiltrado linfocítico crônico localizado principalmente nos septos fibrosos. Ocorre redução importante do infiltrado inflamatório 1 (C, F) e 2 meses (D, G) após a infusão das células (Coloração HE; Magnificação 100X; Barra de calibração 100 µm). (H) Fígado normal: ocorre deposição de colágeno apenas em volta dos vasos sanguíneos (setas). (I, L) Fígado cirrótico mostrando deposição intensa de colágeno com septos espessos conectando os nódulos de regeneração. Um (J, M) e dois meses (K, N) após a terapia esse resultado se mantém embora os septos pareçam mais finos (Coloração Picosírius; Magnificação 40X; Barra de calibração 250 µm).

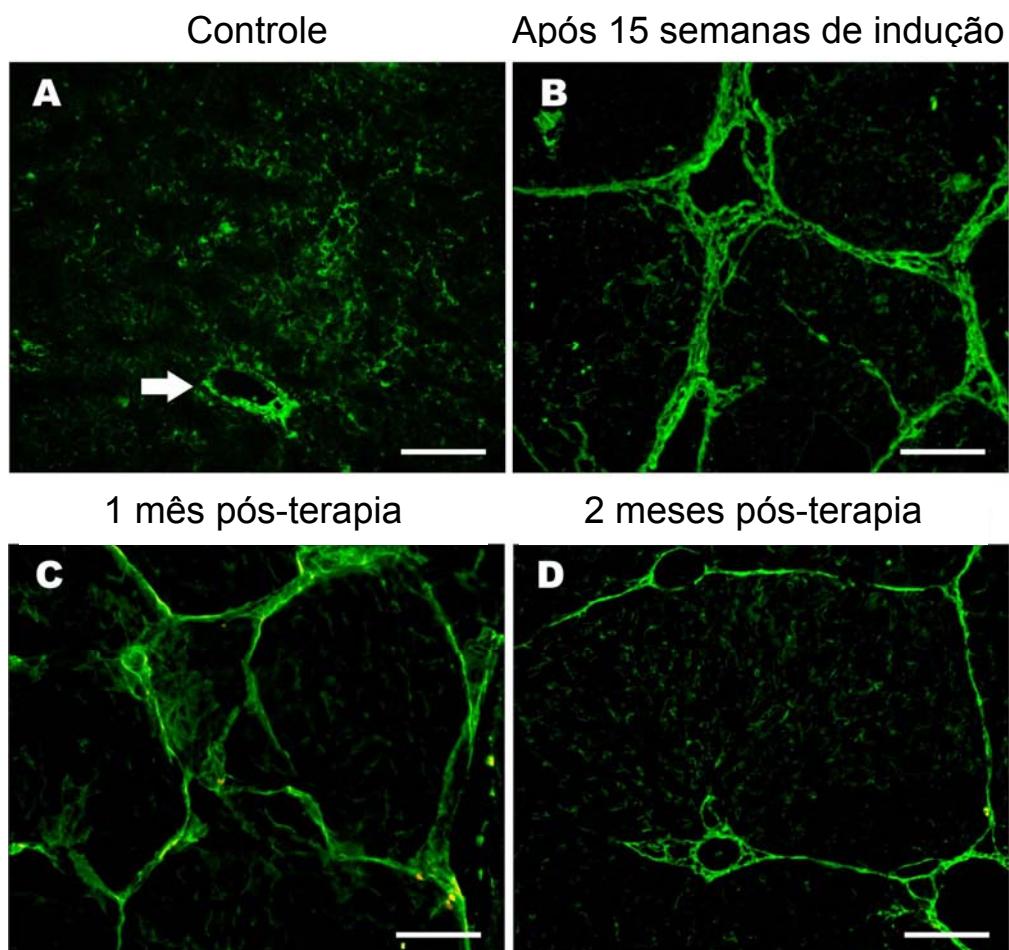


Figura 14. Imagens representativas mostrando imunofluorescência indireta para colágeno do tipo I. (A) Fígado normal mostrando deposição de colágeno somente ao redor dos vasos sanguíneos (seta) e como pequenas fibrilas no parênquima. (B, C e D) Imagens mostram deposição de colágeno I no fígado agredido cronicamente e 1 e 2 meses após a infusão das MSC (Magnificação 100X; Barra de calibração 100 µm).

4.5. Distribuição Sistêmica das MSC Marcadas com ^{99m}Tc após Injeção pela Veia Porta

Com o objetivo de analisar a distribuição das MSC após a injeção pela veia porta, as células foram marcadas com ^{99m}Tc . A viabilidade das células, verificada com o azul de Trypan após a marcação com o ^{99m}Tc , era de 93%. Nossos resultados mostram que seis horas após a injeção das células marcadas pela veia porta, aproximadamente 90% da radioatividade se encontrava no fígado (Figura 16).

4.6. As MSC não contribuem para a melhora funcional na hepatopatia crônica

Após a seleção dos animais para a terapia celular, eles foram divididos em dois grupos: 8 receberam MSC e 6 receberam placebo. Duas semanas após a cirurgia para injeção das células, novas amostras de sangue foram colhidas. A ALT e AST haviam retornado para os valores normais sem diferenças entre os grupos tratado e placebo. Esse resultado se manteve 1 e 2 meses após a infusão das células (Figura 17).

Por outro lado, a albumina ainda se encontrava diminuída 15 dias após a injeção das MSC, mas novamente não foram encontradas diferenças entre os grupos tratado e placebo. Esse resultado se manteve até 1 mês após a infusão das células. Entretanto, 2 meses após a injeção, a albumina também retornou

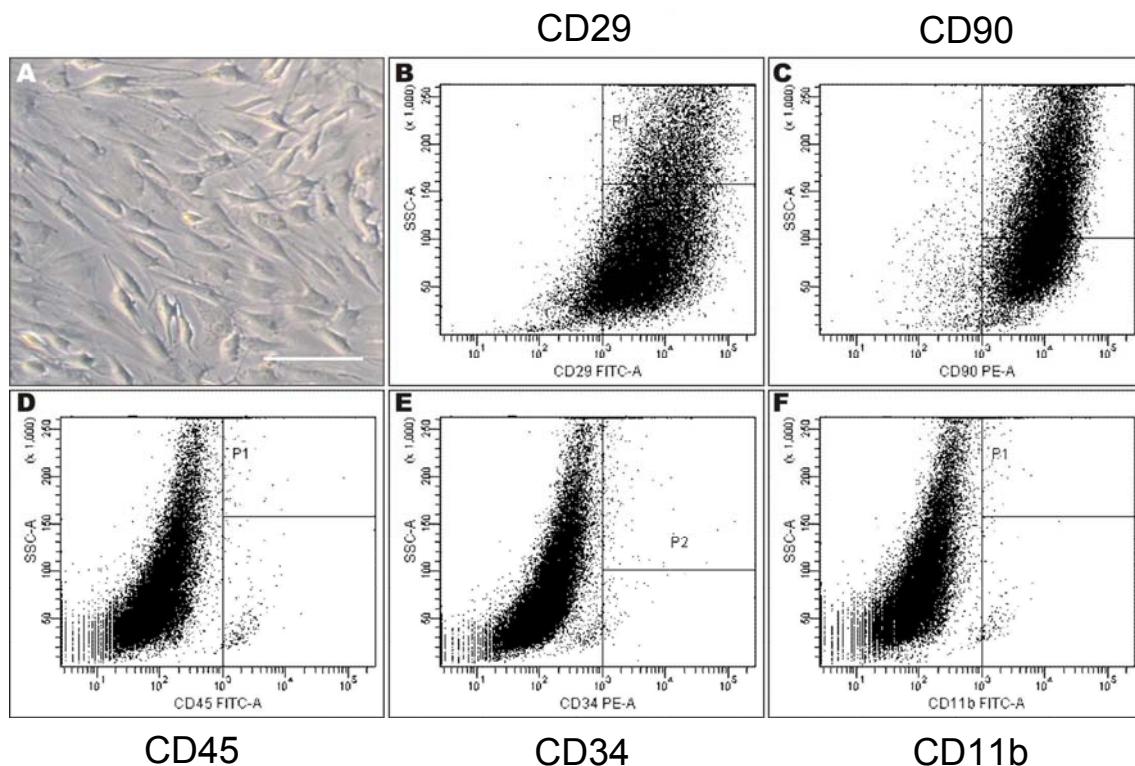


Figura 15. Caracterização das MSC. (A): Após 7 passagens, as células se apresentavam com uma morfologia semelhante a de um fibroblasto. Elas foram incubadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. A expressão de (B): CD29 e (C): CD90 era superior a 90%. A expressão de (D): CD45, (E): CD34 e (F): CD11b era inferior a 1,2%.

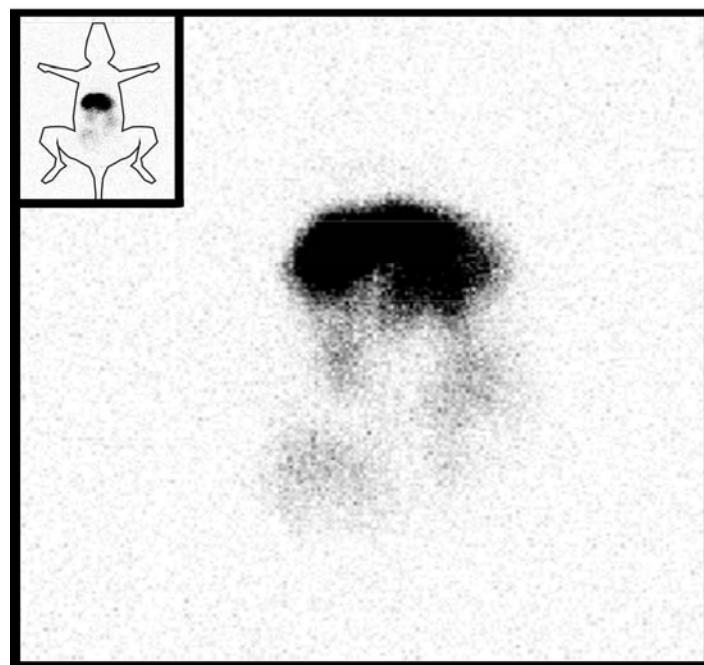


Figura 16. Distribuição sistêmica das células marcadas com ^{99m}Tc . Seis horas após a infusão, a radioatividade estava predominantemente localizada no fígado, indicando que a injeção intraportal foi eficiente e que as MSC chegaram ao fígado de maneira adequada. No quadrante superior direito encontra-se uma representação esquemática da posição do rato no momento do exame.

para valores normais sem diferenças entre os grupos tratado em placebo (Figura 17). É importante destacar que não havia diferença estatística entre os parâmetros bioquímicos dos grupos placebo e tratado previamente à infusão das MSC (Figura 18).

4.7. As MSC não contribuem para a redução da fibrose

A histomorfometria foi utilizada para estimar a quantidade de fibrose presente no tecido hepático. As áreas coradas em vermelho pelo picrosírius foram medidas e calculadas como um percentual da área total do tecido. Os animais controles apresentavam $0,708 \pm 0,108$ % de colágeno no fígado, correspondente às fibras encontradas ao redor dos vasos. Após 15 semanas de agressão, o conteúdo de colágeno era de $8,198 \pm 1,108$ % ($P=0,001$ – Figura 19). Portanto, houve um aumento importante da fibrose em comparação aos animais normais.

As biópsias obtidas um mês após a injeção das células mostraram uma área de colágeno de $5,314 \pm 1,103$ % no grupo tratado comparado a $7,585 \pm 1,549$ % no grupo placebo. Esses resultados não apresentaram diferenças significativas ($P=0,2419$ – Figura 19).

Quando os animais foram sacrificados, dois meses após a infusão das células, a área de colágeno no grupo tratado era de $4,794 \pm 0,640$ %, enquanto no grupo placebo era de $5,441 \pm 1,121$ %. Mais uma vez, não havia diferença significativa entre os grupos ($P=0,6045$ – Figura 19).

Com o objetivo de verificar a presença de alguma diferença na evolução da área de fibrose nos grupos experimentais, utilizamos o teste não-paramétrico de

Mann-Whitney. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos placebo e tratado comparando-se as variações da área de fibrose (*i.e.* delta de fibrose) ao longo do tempo.

4.8. As MSC não ficam retidas no fígado

Com o objetivo de buscar as células no tecido hepático após a injeção, elas foram marcadas com Hoescht 33342 previamente à infusão pela veia porta. Não foram encontradas células marcadas com Hoescht um e dois meses após a infusão em mais de 20 campos analisados pertencentes aos animais do grupo tratado.

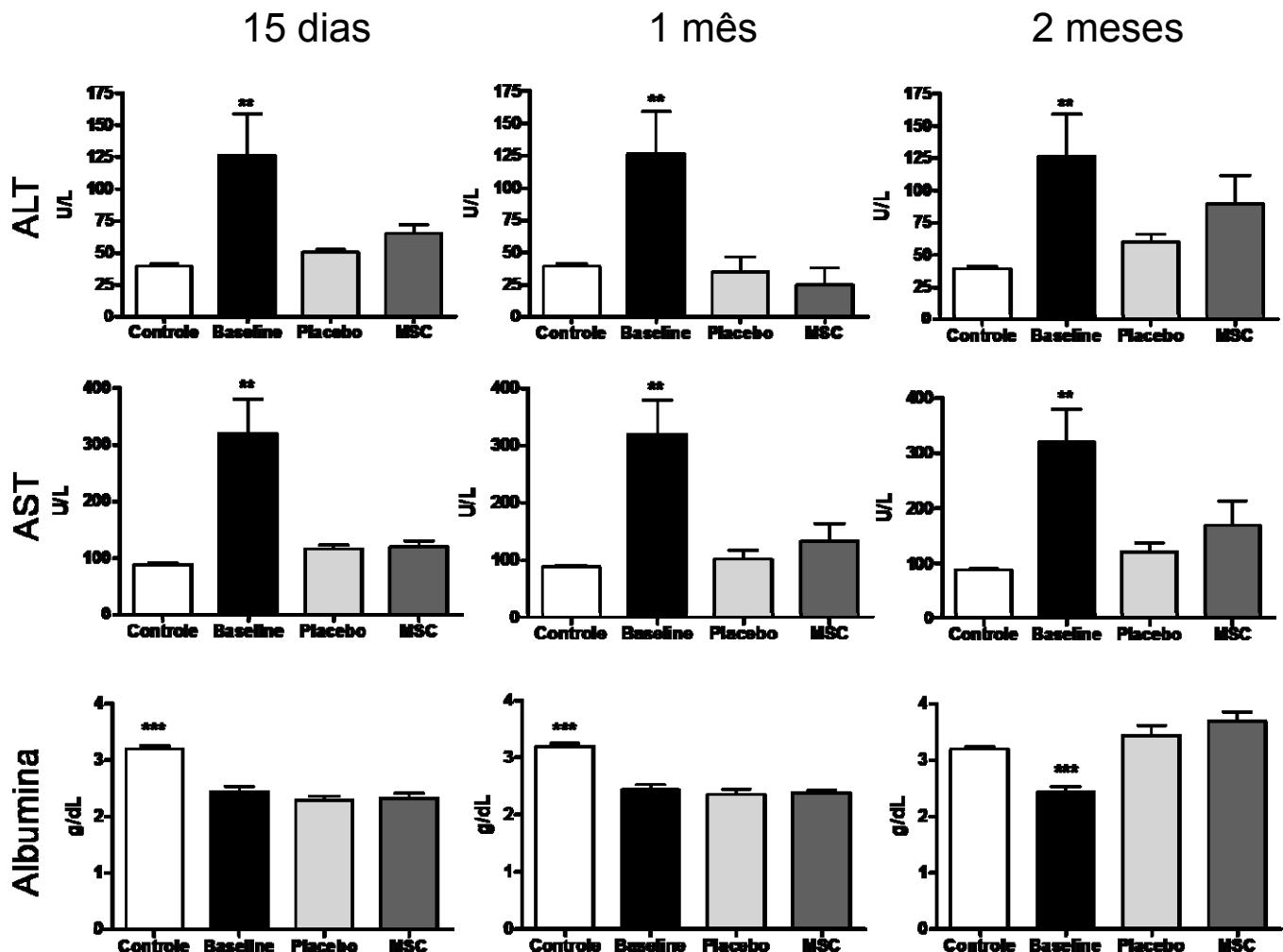


Figura 17. Marcadores bioquímicos de lesão e função hepáticas após a infusão de células ou placebo. Controle: representa animais normais. Baseline: representa os animais que receberam CCl₄ e álcool durante 15 semanas. ALT e AST retornaram a valores normais 15 dias após a injeção de MSC ou placebo e esses valores mantiveram-se inalterados após 1 e 2 meses. Não há diferença significativa entre placebo e MSC. (**P<0,05). A albumina ainda se encontrava reduzida 15 dias e 1 mês após a injeção das células ou placebo; ***P<0,001 comparado a todos os grupos. Entretanto, após dois meses a albumina também retornou a valores normais, novamente sem diferença significativa entre placebo e MSC (Controle n=10, Baseline n=14, Placebo n=6, MSC n=8).

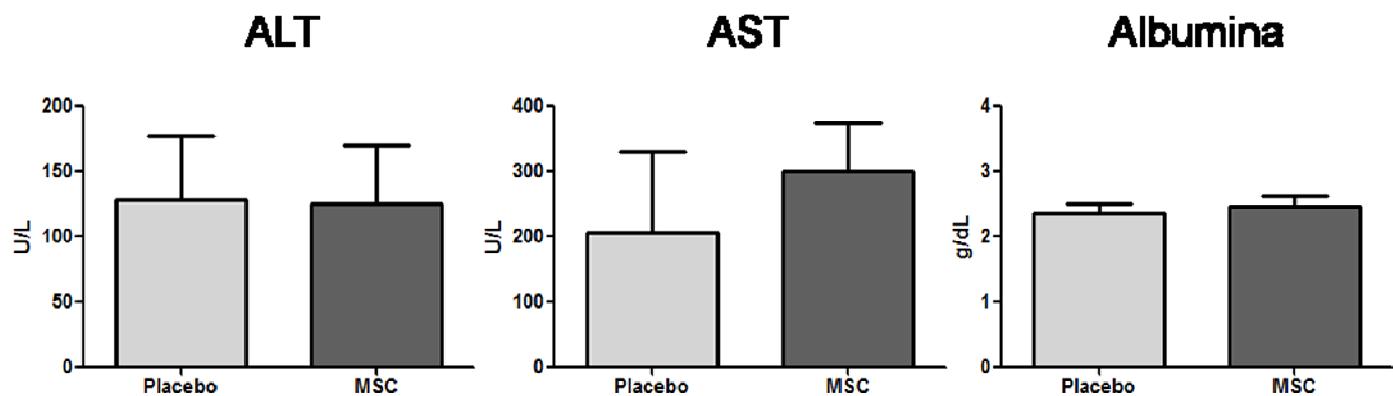


Figura 18. Marcadores bioquímicos de lesão e função hepáticas previamente à infusão das MSC ou de placebo. Não havia diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais antes da terapia celular (Placebo n=6, MSC n=8).

Área de Fibrose

15 semanas de indução 1 mês pós-terapia 2 meses pós-terapia

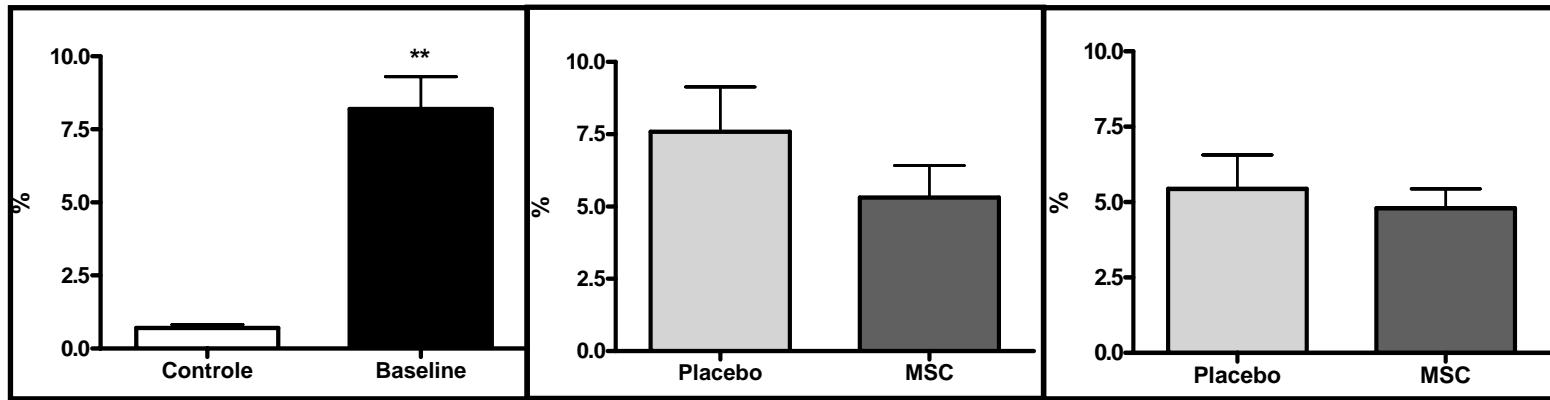


Figura 19. Quantificação da fibrose realizada em campos aleatórios corados com picrosírius (área de colágeno / área total). Controle: representa animais normais. Baseline: representa os animais que receberam CCl₄ e álcool durante 15 semanas. A comparação entre esses grupos mostra fibrose intensa nos animais agredidos (gráfico da esquerda; **P=0,001). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos MSC e placebo 1 e 2 meses após a infusão das células (P=0,2419 and P=0,6045 respectivamente; Controle n=10, Baseline n=14, Placebo n=6, MSC n=8).

5. DISCUSSÃO

As células da medula óssea (CMO) têm sido intensamente estudadas nos últimos anos como uma nova opção terapêutica para diversas doenças, inclusive aquelas que acometem o fígado. Embora não se tenha chegado a um consenso sobre o potencial de diferenciação e as aplicações clínicas dessas células, vários trabalhos publicados recentemente criaram expectativas sobre esse tipo de abordagem terapêutica.

Diversos estudos já demonstraram a capacidade de as CMO se diferenciarem em hepatócitos, embora os mecanismos exatos desse processo ainda não tenham sido elucidados. Zhan e colaboradores demonstraram que células tronco hematopoiéticas (HemSC) transplantadas em ratos tratados com CCl₄ durante 6 semanas expressavam albumina mas não expressavam α-actina de músculo liso, um marcador de células estreladas (HSC) ativadas [65]. Entretanto, essas células eram encontradas no tecido hepático apenas esporadicamente. Em um outro trabalho, Lagasse e colaboradores utilizaram um modelo fatal de tirosinemia do tipo 1 através de camundongos deficientes na enzima fumaril-acetoacetato hidrolase (FAH) e verificaram que, após irradiação e reconstituição da medula com células de um animal transgênico ROSA26, 4 de 9 animais sobreviveram até 7 meses [41]. Trinta a 50% do fígado desses animais sobreviventes apresentavam expressão de β-galactosidase, indicando a presença de células derivadas do doador. Além disso, todos apresentavam melhora significativa de parâmetros bioquímicos do sangue. A seguir, as HemSC de camundongos ROSA26 foram separadas por citometria de fluxo e transplantadas nos animais FAH-deficientes irradiados, sendo demonstrado que a melhora obtida era proporcionada por essa população de células da medula

óssea [41]. Entretanto, o mesmo grupo relatou em outro trabalho que a substituição de hepatócitos pelas HemSC era um evento lento e raro [66].

Por outro lado, existe um crescente questionamento na literatura sobre a real capacidade das HemSC originarem linhagens de origem não-hematopoiética. Wagers et al utilizaram um modelo de irradiação letal em camundongos com reconstituição da medula óssea realizada mediante a injeção de HemSC positivas para proteína fluorescente verde (GFP – do inglês *green fluorescent protein*) [67]. Apesar de existir uma reconstituição robusta dos leucócitos de sangue periférico com células GFP positivas, não foram encontradas células em tecidos como cérebro, rim, intestinos, fígado e músculo. Os autores concluíram, portanto, que a transdiferenciação das HemSC circulantes era um evento extremamente raro [67]. Recentemente, Thorgeirsson e Grisham revisaram os trabalhos que colocam as HemSC como fonte de hepatócitos [68]. Após analisarem 77 artigos, eles concluíram que a transdiferenciação das HemSC em hepatócitos é um evento infrequente e que essa não é uma via efetiva na maioria das condições experimentais apresentadas [68]. Por fim, a capacidade de transdiferenciação das HemSC também já foi questionada em outros órgãos, como o coração [69].

Por tudo isso, uma outra população de CMO vem ganhando atenção nos últimos anos: as células mesenquimais estromais (MSC). Como já foi mencionado, essas células apresentam uma marcante plasticidade, podendo dar origem a diversos tecidos de origem mesenquimal como ossos, cartilagens, músculo, tecido adiposo, tendões e ligamentos [45]. Adicionalmente, são de fácil obtenção e manejo e apresentam alto potencial de expansão *in vitro* [46], o que as torna uma população atraente para o uso clínico.

Além disso, já foi demonstrado que as MSC podem se diferenciar *in vitro* em tecidos de origem não-mesenquimal, inclusive em hepatócitos. Sai-Nan Shu e colaboradores mostraram que MSC cultivadas com dexametasona, insulina, EGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF – do inglês *fibroblast growth factor*) ácido e básico, e fator de crescimento de hepatócitos (HGF – do inglês *hepatocyte growth factor*) expressavam albumina e citoqueratina-18 [50]. Lange e colaboradores demonstraram que MSC em cocultura com hepatócitos e na presença de dexametasona, HGF, FGF tipo 4, EGF e do fator de células tronco (SCF – do inglês *stem cell factor*) passavam a expressar albumina, α-feto proteína e citoqueratinas 18 e 19 [52]. Além disso, Luk et al relataram que MSC cultivadas na presença de hepatócitos sem a adição de fatores de crescimento também passavam a expressar albumina e α-feto proteína [53].

Embora o potencial de diferenciação das CMO em hepatócitos tenha sido demonstrado *in vitro*, ainda é controverso se essas células são capazes de recuperar a função e reduzir o remodelamento tecidual hepáticos. Já existem alguns estudos publicados mostrando o efeito do transplante de diferentes populações de CMO em modelos experimentais de hepatopatias. Sakaida e colaboradores utilizaram um modelo em que camundongos eram submetidos a agressão hepática durante 4 semanas com CCl₄, recebiam o transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) e a agressão era mantida por períodos variáveis de 1 a 4 semanas após a injeção das células [54]. Eles observaram que houve uma redução significativa no conteúdo de fibrose e de hidroxiprolina nos animais que continuavam a ser agredidos por 4 semanas após o transplante celular em relação aos animais que eram agredidos somente por 1 semana. Além disso, os animais transplantados apresentavam um aumento na expressão de MMPs e uma redução na expressão

das TIMPs, bem como aumento dos níveis séricos de albumina e da taxa de sobrevivência [54]. Na tentativa de identificar a população responsável por esse efeito, foram utilizadas células Liv8-positivas e Liv8-negativas. As células Liv8-positivas são de origem hematopoiética, uma vez que a maioria das células expressa c-kit, CD45, CD90 e B220, um marcador de linfócitos B. Apenas a fração de células Liv8-negativas foi capaz de promover redução no conteúdo de hidroxiprolina, indicando que a população não-hematopoiética era a responsável pela melhora observada [54]. Em um segundo artigo, esse mesmo grupo demonstrou que o transplante conjunto das CMMO com o FGF do tipo 2 tinha um efeito sinérgico na promoção de melhora em um mesmo modelo experimental [55].

Oyagi e colaboradores mostraram que MSC mantidas em cultura com HGF e dexametasona por 2 semanas eram capazes de reduzir fibrose e aumentar os níveis de albumina em ratos que receberam CCl₄ [56]. A injeção das células foi feita imediatamente após a primeira dose de CCl₄ e a agressão foi mantida pelas 4 semanas seguintes. Merece destaque o fato de que esse efeito não era observado com o uso de células não tratadas com HGF. Entretanto, esses autores mostram um percentual de fibrose de apenas 0,9% nos animais tratados com CCl₄ por 4 semanas, o que, no caso do nosso estudo, é o valor de fibrose obtido para animais completamente normais, correspondendo às fibras presentes ao redor dos vasos. Além disso, a redução de fibrose promovida pelas MSC tratadas com HGF foi de 0,9 para 0,7% [56].

Em outro trabalho, Fang e colaboradores demonstraram que a infusão de MSC Flk1 positivas era capaz de reduzir a fibrose e o conteúdo de hidroxiprolina após 5 semanas de agressão com CCl₄ [57]. É importante observar que esse efeito era visto somente quando as células eram injetadas imediatamente após a primeira

dose de CCl₄. Caso a injeção das MSC fosse feita uma semana após o início da agressão, ao final de 4 semanas não havia qualquer sinal de melhora. Também foi vista uma redução dos níveis de ALT nesse mesmo grupo, porém não havia diferença nos valores de bilirrubina [57].

Embora vários grupos já tenham demonstrado benefício da injeção de CMO em modelos animais, algumas considerações precisam ser feitas. A primeira é o curto tempo de agressão utilizado nesses modelos: entre 4 e 8 semanas. A grande questão é que a clínica da cirrose hepática em humanos se caracteriza por longos períodos de evolução, podendo chegar a 20 anos. Portanto, os resultados obtidos por esses grupos são pouco reproduzíveis na clínica por se utilizarem de uma agressão mais aguda. Uma outra questão é o momento da injeção das células. Em todos os trabalhos mostrados, o CCl₄ era mantido por um período mínimo de 4 semanas após a infusão das MSC e, em dois deles, essa infusão era feita imediatamente após a primeira dose de CCl₄. De fato, isso também não reflete uma situação clínica real, uma vez que a maioria dos pacientes só procura auxílio médico com a doença já instalada e sintomática.

Por outro lado, Popp e colaboradores demonstraram que MSC transplantadas em um modelo de agressão muito leve, apenas com o objetivo de fornecer um estímulo regenerativo, não eram capazes de permanecer no fígado [58]. As células eram infundidas no dia zero, os animais recebiam 2 doses de CCl₄ nos dias 14 e 28, e eram sacrificados após 60 dias da infusão das MSC. Não foi possível encontrar qualquer célula após esse período, ao passo que com o transplante de hepatócitos no mesmo modelo experimental ocorria não só a permanência das células como também proliferação [58].

Em função desses resultados, especula-se que o benefício descrito das CMO em modelos animais de hepatopatias possa ter uma explicação diferente. Já foi amplamente demonstrado que a resposta imune tem um papel de destaque na fibrogênese. Duffield et al mostraram que camundongos depletados de macrófagos previamente à indução de lesão hepática, tanto os circulantes no sangue quanto as células de Kupffer, apresentavam uma redução do acúmulo de ECM no fígado, confirmando a participação dessas células na indução de fibrose [70]. Há também outras evidências demonstrando a participação de linfócitos T na fibrogênese. Shi e colaboradores mostraram que duas cepas de camundongo, BALB/c e C57Bl/6, apresentam uma resposta diferente ao mesmo protocolo de agressão crônica ao fígado [71]. Os BALB/c desenvolvem fibrose mais grave. Entretanto, ao comparar animais com imunodeficiência combinada grave (SCID – do inglês *severe combined immunodeficiency*), que não apresentam linfócitos T ou B, com background em ambas as cepas, os autores verificaram que o padrão de fibrose tornava-se semelhante e concluíram que os linfócitos T e B têm uma importante participação na fibrogênese [71]. Safadi et al demonstraram que camundongos transgênicos super-expressando interleucina-10 (IL-10) e agredidos cronicamente apresentavam menos fibrose do que animais selvagens [72]. Esse efeito foi atribuído às ações da IL-10 sobre a população de linfócitos T CD8+ que encontrava-se significativamente reduzida nos transgênicos em relação aos animais selvagens após a indução de fibrose. Além disso, os autores demonstraram que a transferência de linfócitos T CD8+ para camundongos SCID após a indução de lesão hepática crônica provocava o aparecimento de fibrose nos animais receptores [72].

Nessa perspectiva, já se sabe também que as MSC apresentam receptores *toll-like* que são capazes de responder a sinais de perigo e são responsáveis por

guiar a migração e as respostas imunomodulatórias dessas células [73]. Portanto, é possível que as propriedades imunomodulatórias amplamente conhecidas das MSC [74, 75, 76] atuem regulando a resposta imune nos animais agredidos inibindo a resposta fibrogênica dos macrófagos, linfócitos T CD4+ e CD8+, e linfócitos B. Assim, a injeção das células logo após o início da agressão poderia prevenir a formação da fibrose, o que não ocorreria mais com a injeção das MSC mediante fibrose já instalada.

Com o objetivo de testar essa hipótese, nosso grupo realizou um trabalho recentemente aceito para publicação [77 – Anexo 8.2]. Nesse trabalho foi utilizado o mesmo modelo experimental de 15 semanas de administração de álcool e CCl₄, porém a injeção de células mononucleares da medula óssea era realizada a cada 15 dias a partir do primeiro mês de agressão hepática até o final das 15 semanas, quando os animais eram sacrificados. Não observamos qualquer melhora da função hepática ou redução da fibrose nos animais tratados, excluindo, portanto, a necessidade de infusão das células durante a agressão para garantir a melhora. Entretanto, ainda permanece a questão da influência do tempo durante o qual a agressão hepática é mantida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico das MSC em um modelo de lesão hepática crônica e grave, com um período de agressão duas vezes mais longo do que os previamente publicados na literatura. Nesse sentido, tentamos recriar em nosso modelo a apresentação clínica que é mais comumente encontrada em pacientes com doença hepática crônica: longos períodos de evolução com início do tratamento após a instalação da doença. A capacidade das MSC de melhorar a função e reduzir a fibrose hepática foi avaliada sob essas condições.

Em nosso estudo, a ALT e AST retornaram a valores normais 15 dias após a interrupção da agressão ao fígado nos grupos placebo e tratado (Figura 17). Isso indica que os marcadores de lesão tendem a se normalizar precocemente com a suspensão da lesão, o que é esperado uma vez que ocorre uma redução da morte hepatocitária resultando em uma menor liberação dessas enzimas para a circulação. Aparentemente, em um período de duas semanas, as MSC não foram capazes de reduzir a lesão dos hepatócitos visto que não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais tratados com células ou placebo. Todavia, não é possível descartar que as MSC possam ter contribuído para a normalização da ALT e AST em um período inferior a duas semanas após sua infusão.

Por outro lado, a recuperação funcional, representada pelos níveis séricos de albumina, levou mais tempo do que a dos marcadores de lesão. Apenas dois meses após a interrupção da agressão a albumina retornou para valores normais (Figura 17). Mais uma vez, a terapia com as MSC não contribuiu para acelerar a recuperação haja vista que os grupos tratado e placebo apresentaram elevações semelhantes dos níveis de albumina ao longo do tempo.

Em concordância com os nossos resultados bioquímicos, as MSC também não foram capazes de reduzir a fibrose hepática (Figura 19). Embora tenha ocorrido uma redução do percentual de fibrose com o tempo, o que caracteriza um fenômeno de remodelamento tecidual esperado e já descrito no fígado lesado [15, 26, 27], não foram encontradas diferenças entre os grupos tratado e placebo, indicando que as MSC não participaram desse processo. Esses resultados foram corroborados pela imunofluorescência indireta que demonstrou a presença do colágeno do tipo 1 (Figura 14).

Portanto, nossos achados constituem evidência de que uma única injeção de MSC não melhora o potencial regenerativo do fígado em um modelo de lesão hepática crônica e grave em ratos. Uma possível explicação é a falha da incorporação das células ao órgão, já que nós não encontramos células marcadas no fígado um ou dois meses após a infusão, o que está de acordo com os resultados de Popp et al [58]. Além disso, é possível que as MSC não sejam capazes de se transdiferenciar em hepatócitos, uma vez que essa capacidade já foi questionada no caso das HemSC e das CMMO [78, 79, 80]. Por fim, é possível que essa transdiferenciação ocorra apenas em frequências baixíssimas. Sato e colaboradores relatam que MSC humanas mantidas em cultura sem a adição de fatores de crescimento e transplantadas em ratos imunossuprimidos submetidos a lesão hepática apenas raramente se diferenciam em hepatócitos [81]. Aurich et al também relatam que esse é um evento raro mesmo quando as MSC humanas são mantidas em cultura com insulina, dexametasona, ácido ascórbico, PDGF e EGF, e transplantadas em camundongos imunodeficientes [82]. A hipótese levantada por esse grupo é a de que as MSC necessitariam de uma vantagem de crescimento sobre os hepatócitos do hospedeiro. Assim, seria necessária uma alta pressão seletiva para que essas células proliferassem, diferenciassem e fossem incorporadas ao fígado receptor [82]. Essa pode ser uma possível explicação para a validação do potencial terapêutico das CMO nos modelos animais em que a agressão é mantida após o transplante celular.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que:

- Ocorre aumento importante no conteúdo de colágeno hepático após 15 semanas de administração de tetracloreto de carbono e álcool, indicando a indução de fibrose hepática avançada.
- As células mesenquimais estromais de medula óssea usadas em nosso estudo preenchem os critérios definidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular.
- Ocorre aporte adequado das células mesenquimais estromais da medula óssea ao fígado após 6 horas da injeção pela veia porta, como mostrado pela cintilografia com Tecnécio-99m.
- Não foi possível detectar a presença das células mesenquimais estromais da medula óssea no fígado 1 e 2 meses após a injeção, indicando que essas células não permanecem no fígado.
- A administração de células mesenquimais estromais da medula óssea na presença de disfunção hepática decorrente da agressão crônica grave não é capaz de melhorar a função ou de reduzir a fibrose nos animais tratados.

7. REFERÊNCIAS

1. DESMET VJ. Organizational principles. In: ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 3–15.
2. MOORE KL. As vísceras abdominais. In: Anatomia orientada para a clínica, 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994, p 170–181.
3. NETTER FH. Atlas of human anatomy, 4^a ed. St. Louis: Elsevier, 2006, lâminas 270A, 272A, 273A, 275A, 276B, 297.
4. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Glândulas anexas do tubo digestivo. In: Histologia básica, 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p 270–286.
5. 3B SCIENTIFIC GMBH. 3B MICROanatomy™ Liver, 2004. Disponível em <http://www.3bscientific.com/Datenbank/PDF/k24.pdf>. Acesso em 15 de janeiro de 2008.
6. HUBBARD AL, BARR VA, SCOTT LJ. Hepatocyte surface polarity. In: ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. Disponível em <http://liver.med.tufts.edu>. Acesso em 15 de janeiro de 2008.
7. SEIFTER S, ENGLAND S. Energy metabolism. In: ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. Disponível em <http://liver.med.tufts.edu>. Acesso em 15 de janeiro de 2008.
8. BRAET F et al. Endothelial and Pit cells. In: ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 437–453.
9. KUIPER J et al. Kupffer and sinusoidal endothelial cells. In ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. Disponível em <http://liver.med.tufts.edu>. Acesso em 15 de janeiro de 2008.
10. LI D, FRIEDMAN SL. Hepatic stellate cells: morphology, function and regulation. In: ARIAS IM et al. The liver biology and pathobiology, 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 455–468.

11. ROJKIND M, GREENWEL P. Pathophysiology of liver fibrosis. In: ARIAS IM et al. *The liver biology and pathobiology*, 4^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p 722–738.
12. BATALLER R, BRENNER DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005, vol 115, p 209–218.
13. ROBBINS SL, COTRAN RS, KUMAR VY. Fígado e vias biliares. In: *Patologia estrutural e functional*, 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p 749–807.
14. BARONI GS et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998, vol 27, p 720–726.
15. IREDALE JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007, vol 117, p 539–548.
16. JARNAGIN WR et al. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994, vol 127, p 2037–2048.
17. GREENWEL P, ROJKIND M. Accelerated development of liver fibrosis in CCl₄-treated rats by the weekly induction of acute phase response episodes: up-regulation of alpha1 procollagen and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1997, vol 1361, p 177–184.
18. BORDER WA, NOBLE NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994, vol 331, p 1286–1292.
19. FERREIRA ABH. Novo dicionário da língua portuguesa, 1^a ed, Rio de Janeiro: Nova Fronteira 1975, p 1214.
20. SHERLOCK S, DOOLEY J. Hepato-cellular failure. In: *Diseases of the liver and biliary system*, 11^a ed, Oxford: Blackwell Publishing 2002, p 81–92.
21. ROJKIND M, DUNN MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1979, vol 76, p 849–863.

22. HUNT J. Long-term follow-up of patients with hepatitis B treated with interferon. *Interferons Cytokines* 1992, vol 20, p 6–9.
23. ABDEL-AZIZ G, LEBEAU G, RESCAN PY et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in rats. *Am J Pathol* 1990, vol 137, p 1333–1342.
24. IREDALE JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001, vol 21, p 427–436.
25. WANLESS IR, NAKASHIMA E, SHERMAN M. Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000, vol 124, p 1599–1607.
26. IREDALE JP et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998, vol 102, p 538–549.
27. ISSA R et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004, vol 126, p 1795–1808.
28. FRIEDMAN SL, SCHIANO TD. Cirrhosis and its sequelae. In: GOLDMAN L, AUSIELLO D. *Cecil textbook of medicine*, 22^a ed. Philadelphia: Saunders, 2004, p 936–944.
29. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 2004: Statistical Annex – Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, 2004. Disponível em http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf. Acesso em 16 de janeiro de 2008.
30. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis B, 2000. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. Acesso em 16 de janeiro de 2008.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C, 2000. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acesso em 16 de janeiro de 2008.

32. ROOM R, BABOR T, REHM J. Alcohol and public health. *Lancet* 2005, vol 365, p 519–530.
33. SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE. Morbidade Hospitalar do SUS – Por Local de Internação – Brasil, 2008. Disponível em <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 16 de janeiro de 2008.
34. SETTE H, BACCHELLA T, MACHADO MC. Critical analysis of the allocation policy for liver transplantation in Brazil. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 2003, vol 58, p 179–184.
35. DOMEN J, WAGERS A, WEISSMAN IL. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. In: Regenerative medicine – NIH stem cell report, 2006. Disponível em: http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf. Acesso em 17 de janeiro de 2008.
36. FERRARI G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998, vol 279, p 1528–1530.
37. ORLIC D et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001, vol 410, p 401–405.
38. JACKSON KA et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001, vol 107, p 1395–1402.
39. BRAZELTON TR et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000, vol 290, p 1775–1779.
40. MEZEY E et al. Turning blood to brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000, vol 290, p 1779–1782.
41. LAGASSE E et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000, vol 6, p 1229–1234.
42. PETERSEN BE et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999, vol 284, p 1168–1170.
43. KRAUSE DS et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001, v 105, p 369–377.

44. IANUS A et al. In vivo derivation of glucose competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003, v 111, p 843–850.
45. COLTER DC et al. Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, vol 97, p 3213–3218.
46. PHINNEY DG, PROCKOP DJ. Concise review: mesenchymal stem / multipotent stromal cells (MSCs): the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. *Stem Cells* 2007, vol 25, p 2896–2902.
47. MAKINO S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999, vol 103, p 697–705.
48. NAGAYA N et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005, vol 112, p 1128–1135.
49. TROPEL P et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006, vol 24, p 2868–2876.
50. SHU S et al. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004, vol 10, p 2818–2822.
51. LANGE C et al. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005, vol 37, p 276–279.
52. LANGE C et al. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005, vol 11, p 4497–4504.
53. LUK JM et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cell: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 2005, vol 305, p 39–47.
54. SAKAIDA I et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄ induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004, vol 40, p 1304–1311.

55. ISHIKAWA T et al. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res* 2007, vol 327, p 463–470.
56. OYAGI S et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006, vol 44, p 742–748.
57. FANG B et al. Systemic infusion of Flk+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004, vol 78, p 83–88.
58. POPP FC et al. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 2007, vol 25, p 639–645.
59. PAREDES BD. Modelo Experimental para Lesão Hepática Crônica induzida por Tetracloreto de Carbono e Etanol: Avaliação de parâmetros para diagnóstico indireto da cirrose hepática. Tese de Mestrado 2005 – Curso de Ciências Biológicas – Fisiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.
60. CAMERON GR, KARUNARATNE WAE. Carbon Tetrachloride Cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* 1936, vol 42, p 1–21.
61. HALL PM et al. Hall Models of Alcoholic Liver Disease in Rodents: A Critical Evaluation. *Alcohol Clin Exp Res* 2001, vol 25 (suppl 5), p 254–261.
62. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993, vol 123, p 1939–1951.
63. GUTFILEN B et al. Tc-99m-leukocytes – is it an intracellular labeling? *J Clin Lab Immunol* 1999, vol 51, p 1–7.
64. DOMINICI M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy* 2006, vol 8, p 315–317.
65. ZHAN Y et al. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. *Transplant Proc* 2006, vol 38, p 3082–3085.

66. WANG X et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002, vol 161, p 565–574.
67. WAGERS AJ et al. Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science* 2002, vol 297, p 2256–2259.
68. THORGEIRSSON SS, GRISHAM JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006, vol 43, p 2–8.
69. MURRY CE et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarction. *Nature* 2004, vol 428, p 664–668.
70. DUFFIELD JS et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005, vol 115, p 56–65.
71. SHI Z, WAKIL AE, ROCKEY DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, vol 94, p 10663–10668.
72. SAFADI R et al. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004, vol 127, p 870–882.
73. TOMCHUCK SL et al. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 2008, vol 26, p 99–107.
74. TSE WT et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003, vol 75, p 389–397.
75. RINGDÉN O et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host-disease. *Transplantation* 2006, vol 81, p 1390–1397.
76. INOUE S et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006, vol 81, p 1589–1595.
77. QUINTANILHA LF et al. Bone Marrow Cell Transplant Does not Prevent or Reverse Murine Liver Cirrhosis. Artigo aceito para publicação na revista *Cell Transplantation* em novembro de 2007 (Anexo 8.2).

78. LIAN G et al. Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes in vitro. *Exp Hematol* 2006, vol 34, p 348–358.
79. ROUNTREE CB et al. Bone marrow fails to differentiate into liver epithelium during murine development and regeneration. *Hepatology* 2007, vol 45, p 1250–1260.
80. KANAZAWA Y, VERMA IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, vol 100 (suppl 1), p 11850–11853.
81. SATO Y et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005, vol 106, p 756–763.
82. AURICH Y et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal cells into mouse livers. *Gut* 2007, vol 56, p 405–415.

8. ANEXOS

8.1. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Do Not Reduce Fibrosis or Improve Function in a Rat Model of Severe Chronic Liver Injury. Artigo aceito para publicação na revista Stem Cells em fevereiro de 2008.

Carvalho AB¹, Quintanilha LF¹, Dias JV¹, Paredes BD¹, Mannheimer EG¹, Carvalho FG², Asensi KD¹, Gutfilen B², Fonseca LMB², Resende CMC², Rezende GFM², Takiya CM³, Campos de Carvalho AC¹, Goldenberg RCS¹.

1 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil.

2 Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil.

3 Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil.

Correspondence: Regina Coeli dos Santos Goldenberg, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco G (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho), 2º andar/sala 53 - Cidade Universitária - 21941-902 - Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: rcoeli@biof.ufrj.br. Telephone: +55 21 25626559

Running head: Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Liver Fibrosis

Key words: mesenchymal stromal cells, bone marrow, liver, fibrosis

Support: CAPES-MEC, MCT-PRONEX, FAPERJ, CNPq

Abstract

The objective of our study was to evaluate the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) in a rat model of severe chronic liver injury. Fourteen Wistar female rats were fed exclusively an alcoholic liquid diet and received intraperitoneal injections of carbon tetrachloride every other day during 15 weeks. After this period, 8 animals (MSC group) had 1×10^7 cells injected into the portal vein while 6 animals (placebo group) received vehicle. Blood analysis was performed to evaluate alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and albumin before and 1 and 2 months after cell or placebo infusion. Fibrosis was evaluated before and 1 month after cell or placebo injection by liver biopsies. Two months after cell delivery, animals were sacrificed and histological analysis of the livers was performed. Fibrosis was quantified by histomorphometry. Biopsies obtained before cell infusion showed intense collagen deposition and septa interconnecting regenerative nodules. One month after cell injection, this result was unaltered and differences in fibrosis quantification were not found between MSC and placebo groups. ALT and AST returned to normal values 2 weeks after cell or placebo infusion, without significant differences between experimental groups. Two months after cell or placebo injection, albumin had also returned to normal values and histological results were maintained, again without differences between MSC and placebo groups. Therefore, under our experimental conditions, MSC were unable to reduce fibrosis or improve liver function in a rat model of severe chronic liver injury.

Introduction

The liver is the largest solid organ in the human body and is responsible for multiple and essential functions [1]. Among them are toxic substances metabolic conversion, uptake and storage of amino acids, lipids, carbohydrates and vitamins, biotransformation of hydrophobic substances into water-soluble derivatives and defense against foreign macromolecules and particles such as bacteria [1].

In addition to its many functions, another important characteristic of the liver is its great regenerative capacity in response to injury. However, despite this ability, diseases that cause chronic injury to the liver are capable of disturbing this regenerative process, leading to the development of a common pathology: liver cirrhosis. This disease has many etiologies such as autoimmune hepatitis, alcohol abuse, metabolic and biliary disorders, and viral hepatitis [2]. All of them cause an unbalance between collagen synthesis and degradation [3], resulting in deposition of this protein in liver parenchyma and in a progressive loss of organ function, which culminates with the development of liver failure. At this stage, the only therapeutic option is organ transplantation.

According to the World Health Organization (WHO), the three most prevalent etiologies of chronic liver disease are alcohol consumption and infection by hepatitis B and C viruses [4]. More than 450 million people will develop cirrhosis as a consequence of these diseases [4], which demonstrates the great relevance of liver pathologies as causes of mortality and public health expenses.

Hence, considering the inexistence of therapeutic alternatives other than liver transplantation, the lack of organ availability and the magnitude of chronic liver diseases, it is urgent that new therapeutic approaches are developed. In this context,

the emergence of stem cell research opened new possibilities for the treatment of chronic liver diseases.

Bone marrow cells (BMC) seem to be a promising population since they are easily obtained and manipulated, rejection can be avoided by autologous transplantation and there are no ethical and religious issues concerning their use. Many marrow-derived cell types and experimental models have been used to test the efficacy of cell therapies in liver diseases, leading to divergent results on the actual role of BMC as a new treatment alternative [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Therefore, the purpose of our study was to evaluate whether bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) are capable of reducing liver fibrosis and improving hepatic function in a rat model of severe chronic liver injury.

Material and Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (DHHS Publication No. (NIH) 85-23, revised 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892) as attested by competent institutional board.

Female Wistar rats were obtained from Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF – Rio de Janeiro/Brazil). Animals were housed at controlled temperature (23°C) with daily exposure to a 12:12 light-dark cycle.

Experimental Model

Chronic liver injury was induced in 50 female Wistar rats, weighting 200 - 220g, with low-dose injections of a 20% solution (1:5 in olive oil - dose of 0.05mL/kg) of carbon tetrachloride (CCl_4) (VETEC, Lot 0505638, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) associated to an alcoholic liquid diet in accordance to AIN-93 guidelines [11]. Prior to CCl_4 administration, an adaptation phase was performed with a non-alcoholic liquid diet (control diet) administered for one week followed by a second week of alcoholic diet, that was continued until the 15th week. CCl_4 injections were performed intraperitoneally (i.p.), 3 times a week every other day over 15 weeks.

Control diet ingredients were identical to those used in the alcoholic diet except for alcohol, which was replaced by water in the same volume. Rats were given *ad libitum* access to liquid diets.

After 15 weeks of injury, all rats were submitted to blood tests for the evaluation of liver injury and function. Samples obtained from 10 normal rats, referred to as control, were used to define the normal range for each blood parameter analyzed. This range was calculated by using the mean \pm 2 standard deviations for each test. The specific values were: Alanine Aminotransferase (ALT) 34.02 – 44.34 U/L, Aspartate Aminotransferase (AST) 80.50 – 95.90 U/L, and Albumin 3.075 – 3.306 g/dL.

Only those animals presenting blood values different from the predefined range in all three parameters were used in the study (n=14). These animals were divided in two groups: 8 animals (cell-treated group) were injected into the portal vein with 1×10^7 rat bone marrow MSC diluted in 0.5 mL of Balanced Salt Solution (BSS) and 6 animals (placebo group) were submitted to the same protocol as the cell-treated group, however they received only BSS injections.

Blood Analysis

Rats were anesthetized and 1 mL of blood was drawn from the tail vein. Samples were centrifuged at 3584 x g for 10 minutes and serum was collected. The following parameters were evaluated: ALT (UV-IFCC method), AST (UV-IFCC method) and Albumin (Bromocresol Green method). Samples were analyzed by Bio 200F (BioPlus, São Paulo, SP, Brazil). Blood analyses were performed before cell injection (referred to as baseline) and 15 days, 1 and 2 months after cell infusion.

Cell Isolation and Culture Procedures

Bone marrow cells obtained from femurs of isogenic donor Wistar rats were used in cell therapy. Femurs were harvested and thoroughly cleaned of all muscle tissue. Bone marrow was flushed using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the cell suspension centrifuged in Ficoll gradient at 400 x g for 30 minutes (Histopaque 1083, 1:1, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Mononuclear cells were collected from histopaque medium interface. Cells were washed in BSS twice, counted in hemocytometer and checked for viability using trypan blue.

Cells were then plated in 75 cm² flasks and maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 1 week, during which medium was changed at least twice, washing away all floating hematopoietic cells. Culture medium used was DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA), 2mM L-glutamine (Sigma-Aldrich), and antibiotics (100U/ml penicillin G and 100µg/ml streptomycin, Gibco). At approximately 80 – 90% confluence, cells were detached from the culture flasks with 0.25% trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) and replated. After the seventh replating, cells were again detached and counted. Subsequently they were labeled with Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich) for 20 minutes and washed twice in BSS to remove the unbound Hoescht 33342. This procedure was very efficient, ensuring approximately 100% labeling of cell nuclei. Then, 1x10⁷ cells were diluted in 0.5mL of BSS and injected into the portal vein of each rat.

MSC differentiation protocols

A fraction of these cells were seeded in six-well plates to induce differentiation into osteoblasts and adipocytes. In the osteogenic protocol, MSC were plated at a

density of 10^5 per well and treated for 21 days with the previously described culture medium with the addition of: 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 0.5 μ M ascorbic acid (Henrifarma, São Paulo, SP, Brazil) and 10mM β -glycerol-phosphate (Sigma-Aldrich). Osteogenic differentiation was assessed by Alizarin red staining.

Adipogenic differentiation protocol was the same; however, culture medium was only added with 1 μ M dexamethasone and 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich). MSC differentiation into adipocytes was confirmed by oil red O staining.

Flow Cytometry

A sample of cultured cells was used to analyze the cell phenotype by flow cytometry. Briefly, 3×10^5 cells were labeled at 4°C for 20 minutes in the dark with the following antibodies: anti-CD34-phycerythrin (PE) (ICO 115, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD11b-FITC (both from Caltag Laboratories – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-CD90-PE and anti-CD29-FITC (both from BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Cells were washed twice in PBS before flow cytometry (BD FACSaria, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Isotype controls used were: mouse IgG1-PE with anti-CD34 (Santa Cruz Biotechnology), mouse IgG1-FITC with anti-CD45 and mouse IgG2a-FITC with anti-CD11b (both from Caltag Laboratories), mouse IgG1-PE with anti-CD90 and hamster IgM-FITC with anti-CD29 (both from BD Biosciences). All antibody dilutions were 1:100.

Cell Labeling with Technetium-99m (^{99m}Tc)

In order to analyze biodistribution after injection into the portal vein, 1×10^7 BMCs were labeled with ^{99m}Tc and injected into a separate group of animals ($n=3$) not included in the experimental groups [12]. In short, 500 μl of stannous chloride solution (SnCl_2) were added to the cell suspension in 0.9% NaCl and the mixture incubated at room temperature for 10 minutes. Then, 45 mCi ^{99m}Tc were added and the incubation continued for another 10 minutes. After centrifugation (500 $\times g$ for 5 minutes), the supernatant was removed and cells were washed again in saline solution. The pellet was resuspended in PBS. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion test. Labeling efficiency (%) was calculated by the activity in pellet divided by the sum of radioactivity in pellet plus supernatant. Six hours after injection, total body images were captured for qualitative biodistribution analyses using a gamma camera (GE Integra, General Electronics, Fairfield, CT, USA) equipped with a high resolution collimator. A 20% energy window centered on the 144 keV photo peak of ^{99m}Tc was used.

Surgery

Animals were anesthetized, a 3cm midline vertical abdominal incision was made and the abdominal cavity exposed. A 0.5cm liver biopsy was obtained. Portal vein was isolated from other abdominal structures and MSC were injected directly into the circulation. After injection, the vessel was pressured until bleeding stopped. Subsequently, 1mL of normal sterile saline was administered into the abdomen as fluid replacement. The abdominal wall was closed in two layers in a running fashion. All the procedures were performed under sterile conditions.

Histology

Liver tissue biopsies were obtained just before MSC or placebo injection and 1 month after the procedure. Animals were sacrificed 2 months after cell infusion, when the organ was excised for histology. Liver tissue slices were fixed for 5 hours in Gendre's solution followed by overnight 10% buffered formalin solution (pH 7.2) and embedded in paraffin. Liver samples were sectioned (5 µm) and stained with Hematoxilin & Eosin (H&E) and Sirius red according to standard protocols [13].

Immunofluorescence

Samples were obtained just before and one and two months after cell infusion. Liver tissue was embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands) and preserved at -70°C. Eight µm liver slices were sectioned in cryostat (Leica CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at -20°C and fixed in acetone at 4°C. Indirect immunofluorescence technique was used to reveal collagen type I (1:30, Chemicon – Millipore, Billerica, MA, USA). Secondary antibody used was FITC goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (1:50, Zymed – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Histomorphometry

Histomorphometry was performed using an imaging system constituted by a digital Q-color 5® camera (Olympus, Japan) coupled to an epifluorescence Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Randomly picked fields of Sirius

red sections were captured from each animal, using a magnification 4X objective lens. Quantification was estimated by the percentage of stained area in comparison to the total area of fields examined, using Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) image analysis software.

Statistics

Data were analyzed using one-way ANOVA with Tukey's post-test for multiple comparisons and unpaired t-test (two-tailed). P<0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean \pm SE.

Results

MSC phenotypic characterization

According to the International Society for Cellular Therapy (ISCT), criteria for defining MSC are adherence to plastic, specific surface antigen expression and multipotent differentiation potential [14].

Our cells, purified by adherence to plastic culture flasks, had a spindle-shaped fibroblastic morphology (Figure 1A). Ninety seven percent of our cells were CD90 positive, 92% were positive for CD29, while CD34, CD45 and CD11b expression was negative (Figure 1). Additionally, our cells were capable of differentiating into osteoblasts and adipocytes (data not shown). These findings are in accordance to the ISCT established criteria [14].

Systemic distribution of 99m Tc labeled cells after intraportal injection

Viability of the labeled cells determined by trypan blue exclusion after 99m Tc labeling was greater than 93%. Our results show that, six hours after labeled cell injection through the portal vein, approximately 90 percent of the radioactivity was concentrated in liver parenchyma (Figure 2).

No evidence of MSC contribution to liver function improvement

Control values for ALT, AST and albumin were determined in animals age matched to our experimental group at the time of cell injection (see Methods). It is

widely recognized that experimental models of liver fibrosis have one major problem: the degree of fibrosis in each animal is highly heterogeneous [15, 16, 17]. While some animals show intense extracellular matrix components deposition, others are only mildly affected. For this reason, only animals that were found to have all three blood parameters altered after 15 weeks of liver injury induction were selected for cell therapy.

Fourteen animals were submitted to surgery: eight received MSC and six received placebo. Two weeks after surgery new blood samples were obtained. ALT and AST were no longer different from control values in both groups, additionally, there were no differences between cell-treated and placebo groups. This result remained unaltered one and two months after cell infusion (Figure 3).

On the other hand, albumin was still decreased 15 days after surgery but again no differences were found between cell-treated and placebo groups. This result was unaltered one month after cell infusion. However, 2 months after cell injection, albumin had also returned to normal values with no difference between placebo and cell-treated groups (Figure 3).

Histologic findings of severe chronic liver injury

Normal liver tissue shows hepatocytes radially arranged in plates aligned to sinusoids and converging to centrilobular veins (Figure 4A). Additionally, collagen deposition occurs mostly around vessels (Figure 4E).

Liver biopsies obtained during surgery performed to inject MSC or placebo showed similar characteristics in all 14 animals: global loss of normal parenchymal architecture and a moderate to intense chronic lymphocytic infiltrate located mostly

around portal spaces and within the fibrous septa (Figure 4B). Moreover, Sirius red staining showed formation of regenerative nodules separated by collagen septa (Figure 4F). Even though there were different degrees of histologic derangement, all animals developed severe fibrosis.

After one month, new biopsies were obtained. H&E staining showed marked reduction of inflammatory infiltrate both in placebo and cell-treated groups (Figure 4C). Collagen deposition was comparable to the observed at the moment of cell or placebo injection (Figure 4G).

Two months after surgery, animals were sacrificed. Inflammatory infiltrate was rarely found (Figure 4D), although collagen deposition was still present (Figure 4H).

Abnormal collagen deposits are present in injured liver

To confirm type I collagen presence in liver tissue, immunofluorescence was performed. In control animals, collagen I is present in portal spaces and as tiny fibrils in liver lobules (Figure 4I). In animals submitted to 15 weeks of chronic liver injury, collagen I deposition and formation of regenerative nodules occurred (Figure 4J). Figure 4K and L show, respectively, collagen I deposition one and two months after cell infusion.

MSC do not contribute to fibrosis reduction

In order to quantify the amount of fibrosis over time comparing placebo and cell-treated groups, histomorphometry was performed.

Sirius red stained areas, representing collagen deposition, were measured and expressed as a percentage of total tissue area. Control animals had $0.708 \pm 0.108\%$ of collagen in liver tissue, most of it corresponding to fibers around vessels throughout the organ. Collagen content found in the animals submitted to chronic liver injury during 15 weeks was $8.198 \pm 1.108\%$. Thus, there was an important increase in fibrosis compared to control animals ($P=0.001$ – Figure 5).

Biopsies obtained one month after MSC were injected revealed a collagen area of $5.314 \pm 1.103\%$ in the cell-treated group compared to $7.585 \pm 1.549\%$ in the placebo group. These results are not significantly different ($P=0.2419$ – Figure 5).

When animals were sacrificed, 2 months after cell infusion, collagen area in the cell-treated group was $4.794 \pm 0.640\%$, while in the placebo group it corresponded to $5.441 \pm 1.121\%$. Once more, no significant difference was found among groups ($P=0.6045$ – Figure 5).

No evidence of bone marrow mesenchymal stromal cell retention

In order to track the cells after injection, they were labeled with Hoescht 33342 prior to infusion into the portal vein. No Hoescht labeled cells were found one or two months after cell infusion in more than 20 low power microscope sections examined from all the MSC group animals.

Discussion

Bone marrow derived cells (BMC) have been intensively studied in the past years as an alternative therapy for many diseases, including those that affect the liver. Although no agreement has been reached yet on their differentiation potential or clinical applications, some reports have generated expectations for this kind of therapeutic approach.

Several studies have addressed the differentiating capability of BMC into hepatocytes, although the exact mechanisms leading to this process remain to be unraveled. Zhan and co-workers [18] and Grompe's group [19, 20] have reported that hematopoietic stem cells (HSC) can differentiate into hepatocytes *in vivo*. Some postulate that the mechanism involved is transdifferentiation [21], while others propose that cell fusion to resident hepatocytes is implicated [22, 23, 24, 25]. Moreover, there is still ongoing controversy about whether HSC are really capable of giving rise to lineages of non-hematopoietic origin [26, 27, 28].

For this reason, a different population of BMC gained attention in the past years: mesenchymal stromal cells (MSC). These cells are characterized by a significant plasticity [29, 30, 31], easy accessibility and a marked expansion potential *in vitro*, which are all attractive features for clinical use.

Hepatocyte differentiation from MSC has been described *in vitro*. Sai-Nan Shu and co-workers [32] induced MSC differentiation into hepatocytes using hepatocyte growth factor (HGF) plus acid and basic fibroblast growth factor (FGF). Furthermore, Lange and co-workers have described hepatocytic gene expression in MSC cultured alone [33] or in co-culture with hepatocytes [34], both of which required the presence of HGF, FGF-4 and epidermal growth factor (EGF). On the other hand, Luk and

colleagues [35] described MSC differentiation into hepatocytes when co-cultured with these cells without the addition of growth factors to culture medium, using either normal or injured hepatocytes in the co-culture system.

Even though BMC differentiation potential into hepatocytes *in vitro* has been demonstrated, it is still controversial whether BMC transplantation can recover liver function and reduce tissue scarring *in vivo*. Sakaida and colleagues [5] demonstrated significant fibrosis reduction and albumin increase by transplanting bone marrow mononuclear cells (BMMC) in mice. This effect was attributed to anti-Liv8 negative cells, described as of non-hematopoietic origin. In another study [6], the same group showed that the association of BMMC with fibroblast growth factor 2 (FGF-2) was more efficient in reducing fibrosis in a similar animal model. Oyagi and co-workers [7] showed that MSC cultured with hepatocyte growth factor (HGF) are capable of improving albumin and reducing fibrosis in rats, an effect that was not observed in MSC cultured without HGF. Moreover, Fang et al [8] demonstrated reduction in fibrosis, ALT and bilirubin levels when Flk⁺ MSC were transplanted into injured mice livers.

However, in all these studies the liver aggression period was short (between 2 and 8 weeks) and maintained for a variable number of weeks after cells were transplanted. For instance, in Oyagi's and Fang's papers, aggression was only initiated after cells were delivered. Therefore, it is possible that the period of aggression and the moment in which cell injection is performed influences the result of cell therapy. However, data by our group [36] have shown that injection of BMMC during the course of injury is also ineffective in improving function or reducing fibrosis compared to placebo when a 15 week period of aggression is used.

In another study, Popp and co-workers [9] demonstrated that transplanted MSC could not engraft into the liver of rats subject to a very mild aggression (2 CCl₄ injections in a 2 month period), which had the purpose of providing a regeneration stimulus, but was not able to induce chronic liver injury.

Abdel Aziz and colleagues [10] described fibrosis and ALT reduction with albumin improvement in rats by transplanting MSC. Once more, the injury period was short, although this group demonstrated that cell transplantation could be beneficial after aggression was interrupted.

In this perspective, the beneficial effect of MSC therapy described in these previous studies could have a different explanation. It has already been demonstrated that the immune response might play a major role in fibrosis establishment since macrophages and lymphocytes participate in the fibrogenic process [37, 38, 39]. In addition, MSCs possess toll-like receptors that respond to danger signals and drive their migration and immunomodulatory responses [40]. Thus, it is possible that the immunomodulatory properties of MSCs [41, 42, 43] act regulating the immune response when injury is promoted concurrently with cell transplantation in the liver.

Our study focused on the therapeutic potential of MSC in a model of severe and chronic liver injury, with an aggression period twice as long as all other previously published studies. Furthermore, cell infusion was only carried out after aggression was established and interrupted, so that cells would encounter more of a fibrosis environment and less of an inflammatory process. Thus, we tried to recreate in our model the clinical setting that will be most commonly seen in chronic liver disease patients: long periods of injury and a scarred rather than an inflammatory

tissue. In our study, MSC capability of improving liver function and reducing fibrosis was addressed under these conditions.

We found that ALT and AST returned to normal levels 15 days after interrupting liver injury in both cell-treated and placebo groups. This indicates that soon after aggression is interrupted, damage markers tend to normalize, which is expected since fewer cells will die and these enzymes will no longer be released in the circulation. Apparently, in a two week period, MSC could not contribute to the reduction of hepatocyte damage since differences were not found between experimental groups; although we cannot discard that cell injection might have accelerated the return to normal enzyme levels within the two week period after cell infusion.

On the other hand, functional recovery, as determined by albumin values, took longer than damage markers. Only two months after aggression was interrupted, did albumin levels return to normal values. Once again, MSC therapy did not contribute to accelerate recovery since cell-treated and placebo animals showed similar increase in albumin levels with time.

In agreement with the biochemical results, we found that MSC did not reduce liver fibrosis. Although there was a reduction in fibrosis over time, which is an expected and already described phenomenon of tissue remodeling in the injured liver [15, 16, 17]; no difference was found between placebo and cell-treated groups, indicating that MSC did not participate in this process. These results were corroborated by indirect immunofluorescence of liver type I collagen content.

Our results provide evidence that a single MSC injection does not improve liver regeneration potential in a rat model of severe chronic liver injury. Possible explanations are that cells failed to engraft and/or died, since we could not find

labeled cells either at one or two months after injection, in agreement with Popp's findings [8]. In addition, it is possible that MSC are not capable of transdifferentiating into hepatocytes, given that this capability has already been challenged in the case of HSC and BMMC [44, 45, 46], or that this occurs at a very low frequency, as has been previously reported [47,48,49]. Sato and co-workers [47] describe that human MSC cultured without growth factors differentiate into hepatocytes only rarely when transplanted into immunosuppressed rats. Aurich and colleagues [48] also reported that this was a rare event, even when MSC were cultured with HGF and EGF. Moreover, they hypothesized that stem cells need a growth advantage over host hepatocytes; therefore, a high selective pressure would be required for cells to engraft and differentiate [48]. This is another possible explanation for the fact that several studies that maintain continuous injury to hepatocytes after transplantation validate BMC's therapeutic potential [5, 6, 7, 8].

Acknowledgments

We would like to thank Igor Couto da Cruz for his help with FACS analysis of MSCs and Carmen Lucia Kuniyoshi Rebelatto for her help with MSCs differentiation assays.

References

1. Desmet VJ. Organizational principles. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV et al., eds. *The liver biology and pathobiology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:3–15.
2. Friedman SL, Schiano TD. Cirrhosis and its sequelae. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil textbook of medicine*, 22th ed. Philadelphia: Saunders 2004:936–944.
3. Rojkind M, Greenwel P. Pathophysiology of Liver Fibrosis. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV et al., eds. *The liver biology and pathobiology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:721–738.
4. The World Health Report – Deaths by cause, sex and mortality stratum in World Health Organization regions. Available at <http://www.who.int/en/>. Accessed September 7, 2007.
5. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄ induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304–1311.
6. Ishikawa T, Terai S, Urata Y et al. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res* 2007;327:463–470.
7. Oyagi S, Hirose M, Kojima M et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006;44:742–748.

8. Fang B, Shi M, Liao L et al. Systemic infusion of Flk+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83–88.
9. Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E et al. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 2007;25:639–645.
10. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:893–899.
11. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939–1951.
12. Gutfilen B, Rossini A, Martins FPP et al. Tc-99m-leukocytes – is it an intracellular labeling? *J Clin Lab Immunol* 1999;51:1–7.
13. Dolber PC, Spach MS. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 1993;41:461–469.
14. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cyotherapy* 2006;8:315–317.
15. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538–549.

16. Issa R, Zhou X, Constandinou CM et al. Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004;126:1795–1808.
17. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;117:539–548.
18. Zhan Y, Wang Y, Wei L et al. Differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes in liver fibrosis in rats. *Transplant Proc* 2006;38:3082–3085.
19. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229–1234.
20. Wang X, Montini E, Al- Dhalimy et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002;161:565–574.
21. Jang YY, Collector MI, Baylin SB et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004;6:532–539.
22. Wang X, Willenbring H, Akkari Y et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897–901.
23. Vassilopoulos GP, Wang R, Russel DW et al. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901–904.
24. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinge neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968–973.
25. Camargo FD, Finegold M, Goodell MA et al. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 2004;113:1266–1270.

26. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL et al. Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science* 2002;297:2256–2259.
27. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006;43:2–8.
28. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarction. *Nature* 2004;428:664–668.
29. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
30. Tropel P, Platet N, Platet JC et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:2868–2876.
31. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697–705.
32. Shu S, Wei L, Wang J et al. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2818–2822.
33. Lange C, Bassler P, Lioznov MV et al. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005;37:276–279.
34. Lange C, Bassler P, Lioznov MV et al. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:4497–4504.
35. Luk JM, Wang PP, Lee CK et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cell: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 2005;305:39–47.

36. Quintanilha LF, Mannheimer EG, Carvalho AB et al. Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell Transplant* 2007 (in press).
37. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005;115:56–65.
38. Safadi R, Ohta M, Alvarez CE et al. Immune stimulation of hepatic fibrogenesis by CD8 cells and attenuation by transgenic interleukin-10 from hepatocytes. *Gastroenterology* 2004;127:870–882.
39. Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10663–10668.
40. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB et al. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 2008;26:99–107.
41. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389–397.
42. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host-disease. *Transplantation* 2006;81:1390–1397.
43. Inoue S, Popp FC, Koehl GE et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006;81:1589–1595.

44. Lian G, Wang C, Teng C et al. Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes in vitro. *Exp Hematol* 2006;34:348–358.
45. Rountree CB, Wang X, Ge S et al. Bone marrow fails to differentiate into liver epithelium during murine development and regeneration. *Hepatology* 2007;45:1250–1260.
46. Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(suppl 1):11850–11853.
47. Sato Y, Araki H, Kato J et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756–763.
48. Aurich Y, Mueller LP, Aurich H et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405–415.
49. Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 200;57:223–231.

Legends

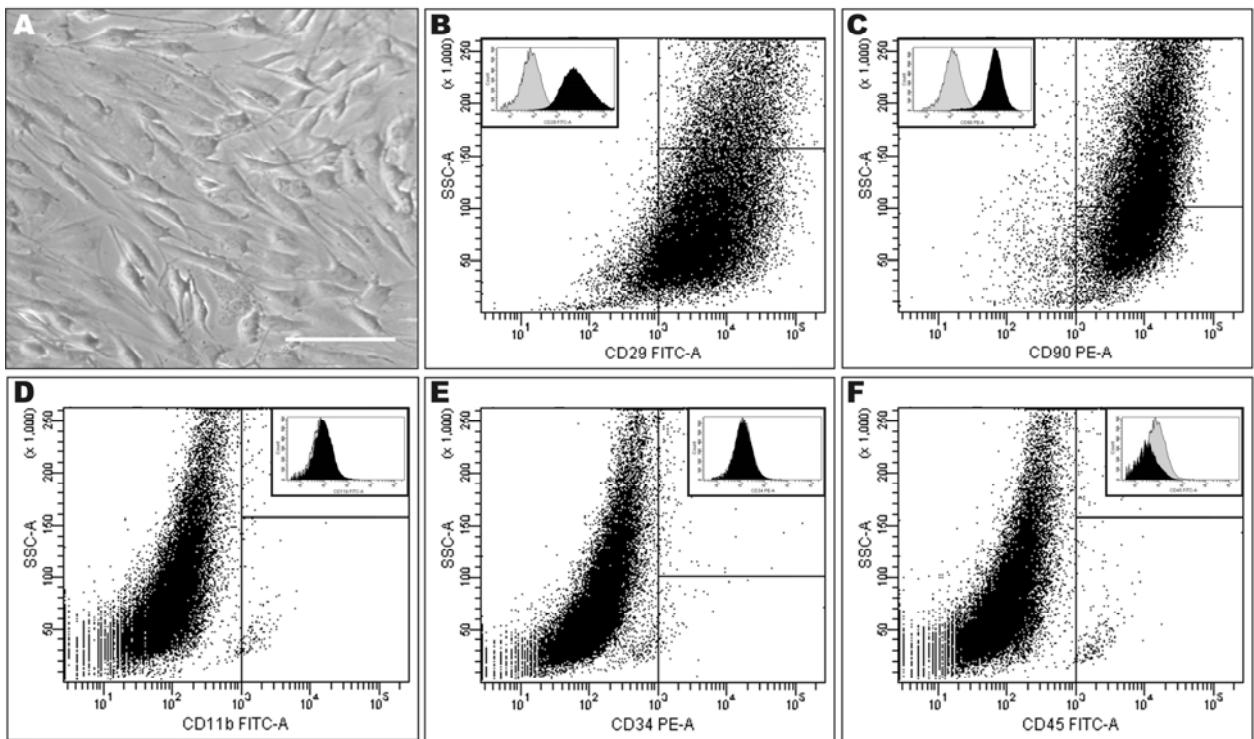
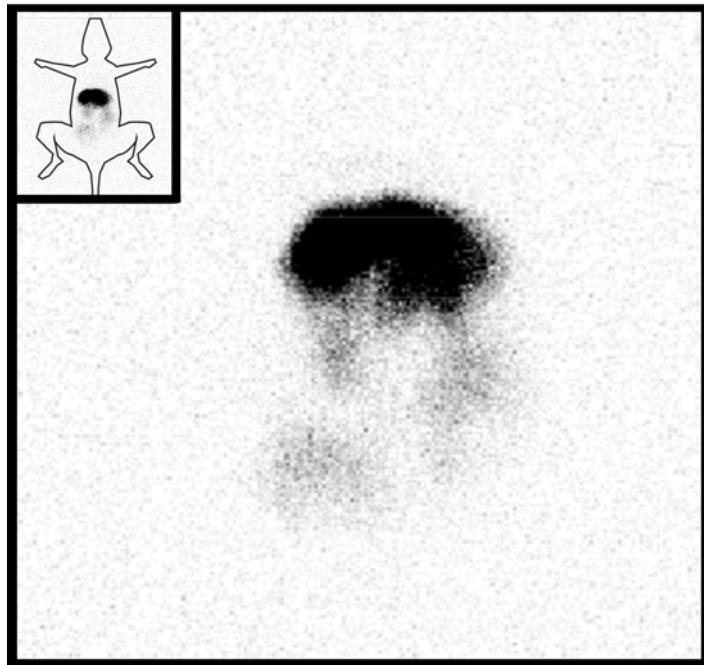
Figure 1. MSC characterization. (A): Cultured MSC, after seven passages, exhibiting a spindle-shaped fibroblastic morphology (Magnification 100X – Scale bar: 100 µm). Cells were incubated with the following antibodies and analyzed by flow cytometry. (B): CD29 and (C): CD90 expression was over 90%. Upper left panels show histograms with isotype controls represented in gray and antibodies in black. (D): CD11b, (E): CD34 and (F): CD45 expression was less than 1.2%. Upper right panels show histograms with isotype controls in gray and antibodies in black.

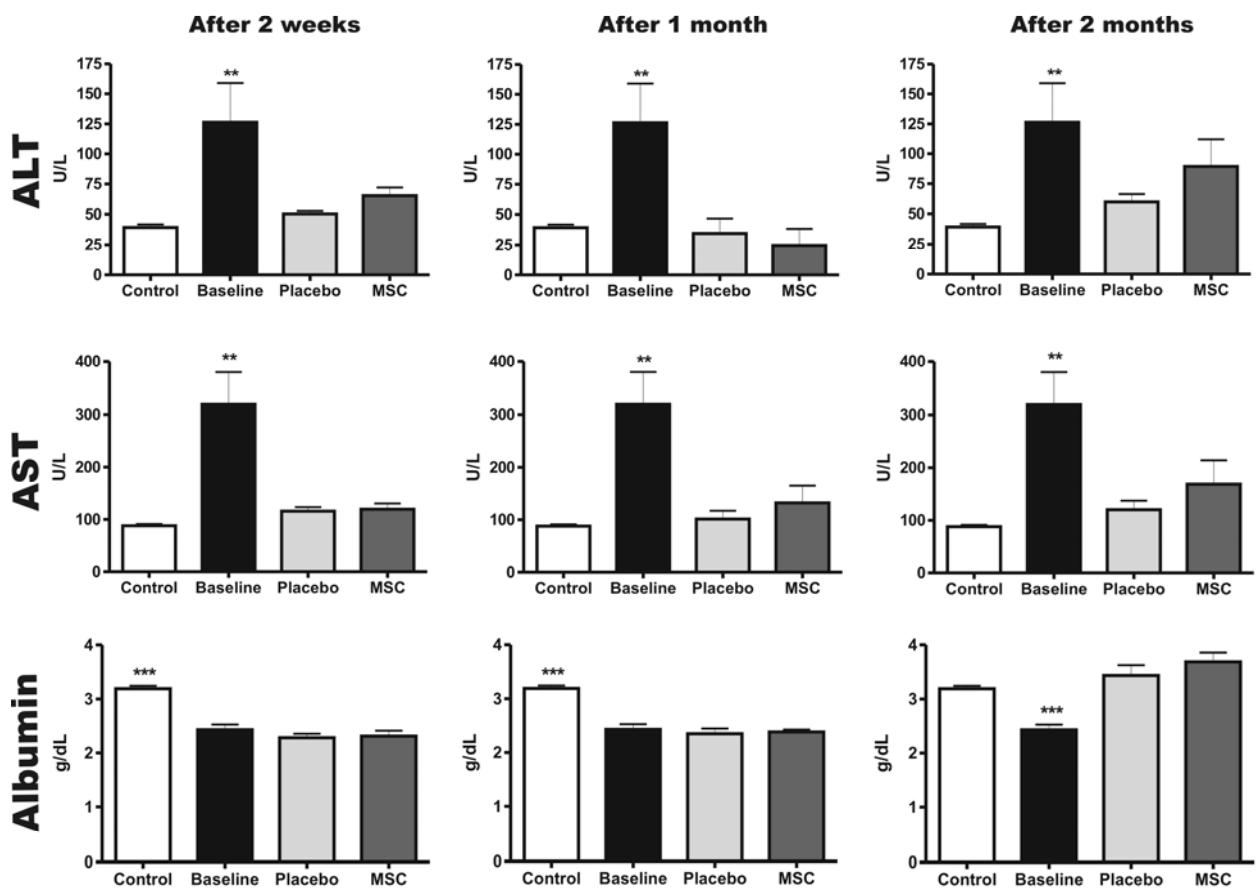
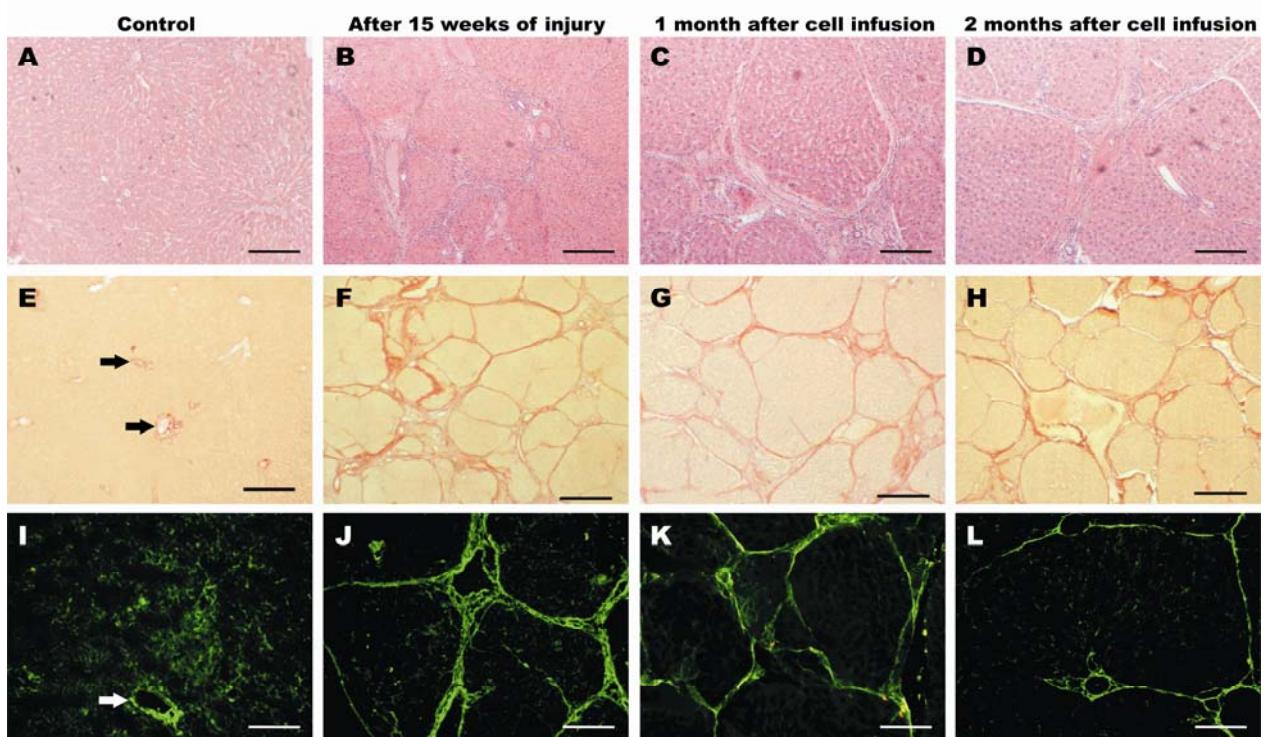
Figure 2. Systemic distribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeled cells. Six hours after cell infusion, radioactivity was mainly located in the liver, indicating that portal vein injection was efficient and that MSC were adequately delivered and retained. Upper right panel shows a schematic image representing rat's position during the exam.

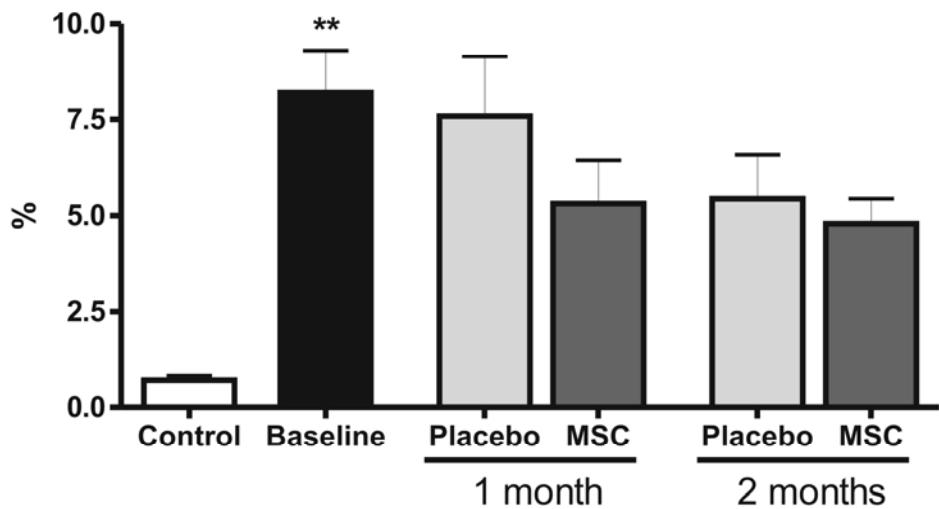
Figure 3. Biochemical markers of liver injury and function over time. ALT and AST returned to control values 2 weeks after cell infusion. These findings were unaltered one and two months after MSC injection ($^{**}\text{P}<0.05$). Albumin values were still reduced 2 weeks and 1 month after cell or placebo injection; $^{***}\text{P}<0.001$ compared to all groups. However after 2 months, albumin returned to control values in both experimental groups; $^{***}\text{P}<0.001$ comparing baseline to all groups. In none of the parameters examined differences were observed between placebo and MSC groups (Control n=10, Baseline n=14, Placebo n=6, MSC n=8).

Figure 4. Representative figures showing structural findings in chronic liver injury. (A) Normal liver: hepatocytes are radially arranged in plates aligned to sinusoids and converging to centrilobular veins. (B): After 15 weeks of injury, a chronic lymphocytic infiltrate is present. (C and D): One and two months after cell or placebo infusion there is marked reduction of the inflammatory infiltrate (H&E; Magnification 100X – Scale bar: 100 µm). (E): Normal liver tissue shows collagen deposition mostly around vessels (arrows). Collagen fibers are stained in red. In F, G and H histology shows intense collagen deposition with septa interconnecting regenerative nodules after 15 weeks of injury and 1 and 2 months after cell therapy, respectively (Sirius red; Magnification 40X – Scale bar: 250 µm). (I): Indirect immunofluorescence revealing type I collagen. Normal liver shows collagen in portal spaces and as tiny fibrils in liver lobules (arrow). J, K and L confirm the presence of collagen I in the regenerative nodules (Magnification 100X – Scale bar: 100 µm).

Figure 5. Fibrosis quantification in Sirius red stained fields (collagen/total area). Comparison between the amount of collagen in control liver and after 15 weeks of liver injury induction (baseline) shows intense fibrosis (**P=0.001). No differences were found between placebo and MSC 1 and 2 months after cell infusion – P=0.2419 and P=0.6045 respectively (Control n=5, Baseline n=14, Placebo n=6, MSC n=8).

Carvalho AB et al - FIGURE 1**Carvalho AB et al - FIGURE 2**

Carvalho AB et al - FIGURE 3**Carvalho AB et al - FIGURE 4**

Carvalho AB et al - FIGURE 5**Fibrosis Area**

**8.2. Bone Marrow Cell Transplant Does not Prevent or Reverse
Murine Liver Cirrhosis. Artigo aceito para publicação na
revista Cell Transplantation em novembro de 2007.**

Quintanilha, L. F.¹; Mannheimer, E. G.¹; Carvalho, A. B.¹; Paredes, B. D.¹; Dias, J. V.¹; Almeida, A. S.²; Gutfilen, B³; Barbosa da Fonseca, L. M.³; Resende, C. M. C.³; Rezende, G. F. M.³; Campos de Carvalho, A. C.¹; Goldenberg, R. C. S.¹

1 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902 , Brazil

2 Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902 , Brazil

3 Faculdade de Medicina - Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, 21941-902 , Brazil

Correspondence: Regina Coeli dos Santos Goldenberg, Avenida Carlos Chagas Filho, 373. Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco G (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho), 2º andar / sala 53 - Cidade Universitária - 21941-902 - Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: rcoeli@biof.ufrj.br.

Telephone: +55 21 25626559

Running Head: Preventive Cell Infusion in Chronic Liver Disease Model

Abstract

Background / Aims: We tested the effect of bone marrow cell (BMC) transplantation in either preventing or reversing cirrhosis on an experimental model of chronic liver disease.

Methods: Female Wistar rats were fed a liquid alcohol diet and received intraperitoneal injections of carbon tetrachloride (CCl_4) over 15 weeks. Ten animals (cell-treated group) received five injections of BMCs during the cirrhosis induction protocol (on the 4th, 6th, 8th, 10th and 12th weeks) and four animals received the cells after liver injury was established through tail vein. Nine animals (non-treated group) were submitted to the previously described protocols however, they received vehicle injections. Analyses were performed to verify whether the infusion of cells was effective in preventing the development of cirrhosis in our model of induction, and if the cells could reverse cirrhosis once it was established. Hepatic architecture and fibrotic septa were analyzed in liver slices stained with hematoxilin & eosin and Sirius red, respectively. Fibrosis quantification was measured by Sirius red histomorphometry. Indirect immunofluorescence was performed to detect the amount of tissue transglutaminase 2. Blood analyses were performed to assess liver injury and function by the assessment of alanine aminotransferase and albumin. Ultrasound was performed to analyze the portal vein caliber and presence of ascitis.

Results: Cirrhosis features (regenerative nodules and fibrous septa) were observed in histopathology after 15 weeks of continuous hepatic injury in non-treated and cell-treated groups. Collagen content, immunofluorescence analysis, biochemical and ultrasound parameters were similar in non-treated and cell-treated groups; however both groups showed significant differences compared to a normal control group.

Conclusion: Cell infusions with bone marrow derived cells seem to be ineffective in

improving morpho-functional parameters of the liver when applied to chronic cases either during or after establishment of the hepatic lesion.

Keywords: Cirrhosis; bone marrow cell; biochemistry; histology; ultrasound.

Introduction

Liver cirrhosis is a worldwide prevalent disease which has serious impacts on public health issues. It derives from chronic injury to the liver that is commonly caused by viral hepatitis and alcoholism (1,47,48).

Despite great regenerative capacity of the liver, successive injuries result in a significant loss of hepatocytes and excessive deposition of extracellular matrix components, leading to irreversible impairment of organ function (12). In such case, the only effective treatment is liver transplantation which, unfortunately, still depends on an extremely short supply of viable organs (48). Therefore, the study of alternative therapies, such as stem cell transplantation becomes of utmost importance.

Most studies performed with cell therapies in liver diseases have been restricted to the therapeutic potential of these cells after a single cell infusion in animals with an already damaged liver (13,39,51). Nonetheless, liver diseases usually have a chronic course, developing over many years before cirrhosis is discovered. Frequently, this evolution cannot be easily arrested since there is still no cure available for diseases such as chronic and autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis and nonalcoholic steatohepatitis, among others. It is clear that an early intervention on cirrhosis development would be more effective than treating the already established disease. Hence, our working hypothesis is the early use of stem cell infusions in hepatic diseases could prevent or delay the progression to cirrhosis, reflecting a greater survival rate as well as improved quality of life for patients.

Among the different stem cell sources, those found in bone marrow are the most studied because they present many advantages, such as capacity to differentiate into a variety of cell lineages *in vitro* and *in vivo*, including hepatocytes (5,7,17,18,19,29,30,34,40,46), the possibility of autologous transplantation and easy access and manipulation. Thus, our goal was to investigate the capacity of these cells to either delay or prevent the installation and progression of liver cirrhosis using a novel model of repeated cell infusions during the course of a chronic liver injury model. To exclude the possibility that injected cells were damaged by the continuous aggression to the liver, we also studied the impact of transplanting bone marrow stem cells after aggression was interrupted.

Material and Methods

Animals

All procedures were performed in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [DHHS Publication No. (NIH) 85-23, revised 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892] as attested by the competent institutional board.

Female Wistar rats (200-220g) were obtained from the *Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho* animal facility (IBCCF – Rio de Janeiro / Brazil). Animals were housed at controlled temperature (23°C) with daily exposure to a 12:12 light dark cycle.

Experimental Model – Preventive cell infusions

Cirrhosis was induced in 15 female Wistar rats (weighing 200 - 220g) with low-dose injections of a 20% solution (1:5 in olive oil - dose of 50 µL per animal) of carbon tetrachloride (CCl₄) (VETEC, Lot 0505638, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) combined with an alcoholic liquid diet in accordance with AIN-93 guidelines (36). Prior to CCl₄ administration, an adaptation phase was performed with a non-alcoholic liquid diet (control diet) administered for one week followed by a second week of alcoholic diet. Injections of CCl₄ were performed intraperitoneally (i.p.), 3 times a week every other day over 15 weeks.

Control diet ingredients were identical to those used in the alcoholic diet except that alcohol was replaced by water in equal volume. Rats were given *ad libitum* access to liquid diets.

Rats subjected to alcoholic diet and CCl₄ injections were divided into two groups: ten animals (cell-treated group) received injections of 3x10⁶ bone marrow cells (BMCs) diluted in 300 µL of Phosphate Buffered Saline (PBS) every 2 weeks starting on the fourth week of cirrhosis induction, totaling five injections. Five animals (non-treated group) were subjected to the same protocol as the cell-treated group however, they only received PBS injections with the same frequency. Injections were performed through the tail vein.

Biochemical, ultrasound and histological analyses were performed on day 0 and on the 15th week of induction. Normal animals – not submitted to the protocol – were used as controls to compare biochemical, ultrasound and histological findings, thus being designated the control group.

Experimental model – Post injury cell infusion

Cirrhosis was induced in 8 rats and methods were identical to the preventive cell infusions group, except that BMCs were not administrated during induction.

After 15 weeks, all rats were submitted to blood tests in order to assess both liver injury and function. These animals were divided into two groups: 4 animals (cell-treated group) received an injection into the tail vein with 3x10⁷ BMCs diluted in 300 µL of PBS; whereas the other 4 animals (placebo group) were submitted to the same protocol as the cell-treated group, however they only received PBS injections.

Both biochemical and histological analyses were performed at 15 weeks of cirrhosis induction and 2 months after cell infusion.

Cell Isolation

BMCs obtained from femurs of isogenic donor Wistar rats were used in transplantation. Femurs were harvested and thoroughly cleaned of all muscle tissue. Bone marrow was flushed using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GibcoTM, Lot No 1355192, Grand Island, NY, USA) and the cell suspension centrifuged in Ficoll gradient at 400 x g for 30 minutes (Histopaque 1083, 1:1; Sigma-Aldrich, Lot 016K6112, Steinheim, Germany). Mononuclear cells were collected from the histopaque medium interface. Cells were washed in PBS twice, counted (hemocytometer) and checked for viability using Trypan blue. Cells were then diluted in 0.3 ml of PBS and injected into the tail vein.

Cell labeling with Technetium-99m

In order to analyze biodistribution after injection through the tail vein, 1×10^6 BMCs were labeled with ^{99m}Tc and injected into a separate group of animals ($n=3$) not included in the experimental groups (10). In short, 500 μl of stannous chloride solution (SnCl_2) were added to the cell suspension in 0.9% NaCl and the mixture incubated at room temperature for 10 minutes. Then, 45 mCi of ^{99m}Tc were added and the incubation continued for another 10 minutes. After centrifugation (500 x g for 5 minutes), the supernatant was removed and the cells washed again in saline solution. The pellet was resuspended in PBS. Viability of the cells was assessed by Trypan blue exclusion test. Labeling efficiency (%) was calculated by the activity in pellet divided by the sum of radioactivity in pellet plus supernatant. Three hours after injection, images were captured for qualitative biodistribution analyses. Whole body images were obtained using a GE Integra gamma camera equipped with a high resolution collimator. A 20% energy window centered on the 144 keV photo peak of ^{99m}Tc was used.

Blood analysis

Rats were anesthetized and 1 mL of blood was drawn from the tail vein. Samples were centrifuged at 3584 x g for 10 minutes and sera collected. The following blood parameters evaluated: Alanine Aminotransferase (ALT) (UV-IFCC method) and albumin (Bromocresol Green method). Samples were analyzed by Bio 200F[®] (BioPlus, Brazil).

Ultrasound assessment

Animals were anesthetized and placed in supine position breathing spontaneously. Thricotomy was performed and Caris Plus[®] ultrasound equipment (Esaote, Italy) was used to analyze the portal vein caliber, liver echogenicity and the presence of ascitis.

Histology

Liver tissue slices were fixed for 5 hours in Gendre's solution followed by overnight 10% buffered formalin solution (pH 7.2) and embedded in paraffin. Liver samples were sectioned (5mm) and stained with H&E and Sirius red according to standard protocols (4).

Immunofluorescence

Liver tissue was embedded in Tissue-Tek[®] OCT compound (Sakura, Japan) and preserved at -70°C. Six µm sections were obtained in a cryostat at -20°C and fixed in acetone at 4°C. Indirect immunofluorescence technique was used to reveal tissue transglutaminase (tTG), using an antibody transglutaminase II Ab-2 (Lab Vision Co., USA) diluted at 1:40 in PBS containing 3% albumin. Sections were

incubated for 12 hours at 4°C and then washed three times in PBS/albumin before being exposed to a fluorescein isothiocyanate (FITC) secondary antibody goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate (ZYMED, USA) diluted at 1:50 for two hours at room temperature.

Histomorphometry

Histomorphometry was performed using an imaging analysis system and a digital Q-color 5° camera (Olympus, Japan) coupled to an epifluorescence microscope Axiovert 100 (Zeiss, Germany). At least ten randomly picked fields of Sirius red and anti-tTG stained sections were captured from each animal, using a magnification 10X objective lens. Quantification was estimated by the percentage of stained area in the total area of the histological fields examined using the Image Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA with Tukey's post-test for multiple comparisons or paired t-test. P<0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean ± SE.

Results

Experimental Model

No deaths occurred during cirrhosis induction. The animal's weight slightly varied in both groups (cell-treated and non-treated). In a previous study, our group has shown that after four weeks of induction the first signs of liver injury emerge. Animals show both steatosis and an initial formation of fibrous septa while albumin values are still normal (data not shown). Therefore, we sought to employ preventive BMCs injections at this point, given that structural abnormalities were found whereas function was not yet impaired. Alternatively, we injected cells after concluding the induction protocol (15 weeks of liver aggression) to test the capacity of the cells to reverse an established cirrhosis (with structural and functional impairment) and also to verify the healing potential of cells not exposed to the toxic agents used to induce the model.

Systemic biodistribution of Technetium-99m labeled cells

Viability of the labeled cells determined by Trypan blue exclusion after Tc labeling was greater than 93%. Our results showed that three hours after labeled cell injection through the tail vein, approximately seventy percent of the radioactivity was concentrated in liver parenchyma (Figure 1).

Blood analysis

Biochemical analyses were performed to verify both the extent of liver injury and the impairment of organ function.

As for the preventive cell infusions, there was no statistically significant difference between cell-treated and non-treated groups in every parameter analyzed on the 15th week, although both differed from the control group (Figure 2). Hepatic injury was evaluated through ALT analysis (control group 39.6 ± 2.1 ; non-treated group 107 ± 25.8 ; cell-treated group 97 ± 12.3 U/L; p<0.001 vs. control group). Hepatic function was evaluated through albumin analysis (control group 3.21 ± 0.56 ; non-treated group 2.45 ± 0.10 ; cell-treated group 2.36 ± 0.13 g/dL; p<0.001 vs. control group).

The post injury cell infusion group showed that although significantly altered after 15 weeks of induction (as shown in Figure 3), two months after cell transplantation or saline infusion, ALT (non-treated group 87.5 ± 14.9 ; cell-treated group 99.2 ± 11.0 U/L; p>0.05) (Figure 3A) and albumin (non-treated group 3.12 ± 0.19 ; cell-treated group 3.32 ± 0.19 g/dL; p>0.05) (Figure 3B) had returned to control values with no differences between cell-treated and non-treated groups.

Ultrasound Assessment

Ultrasound analysis showed an increase in liver echogenicity in all animals (data not shown) and ascitis was observed in thirty percent of cell-treated animals and in forty percent of non-treated animals (p>0.05 Chi-square) (Figure 4). Moreover, there was an increase in portal vein caliber (PVC) in cell-treated (0.232 ± 0.012 cm) and non-treated (0.242 ± 0.012 cm) groups compared to normal values (0.194 ± 0.004 cm) (p<0.001) as shown in Figure 5.

Histology

In the preventive cell infusions group, there was clear evidence of macronodular cirrhosis on the 15th week of induction in both cell-treated and non-treated groups. Liver surface was extremely irregular with multiple nodules and a rigid consistency (Figure 6A). Histological analysis showed liver cirrhosis, characterized by global loss of normal parenchyma architecture and formation of nodules separated by continuous or discontinuous collagen septa associated with an inflammatory infiltrate and macrophages containing pigment (Figure 6B and C). Collagen deposition was intense, forming thick septa interconnecting regenerative nodules (Figure 6D and E). Seventy percent of the animals in the cell-treated group and eighty percent in the non-treated group presented histological features of cirrhosis. The remaining animals in both groups presented features of advanced fibrosis.

Histological findings in the post injury cell infusion group were very similar to those in the preventive cell infusions group in both cell-treated and non-treated groups (data not shown).

Measure of Collagen Content

To measure fibrosis index we quantified collagen deposition into liver tissue. In the preventive cell infusions group, morphometric analysis showed that there was an increase in liver collagen content in both cell-treated ($18.2 \pm 1.5\%$) and non-treated ($23.0 \pm 2.2\%$) groups when compared to the control group ($2.6 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$). However, there was no significant difference between the cell treated and non-treated groups (Figure 7A).

In the post injury cell infusion group, the amount of collagen found after 15 weeks of chronic liver injury induction was not significantly different from the content in the preventive cell infusions group (data not shown). Moreover, there was no difference between cell-treated ($14.25 \pm 0.45\%$) and non-treated ($12.59 \pm 0.91\%$) groups two months after cell transplantation or saline infusion (Figure 7B).

Correlation of functional and histological parameters

In order to correlate liver function with histology, a linear regression of ALT and albumin levels in blood versus collagen content was performed. As expected, a direct relation between alterations in blood levels of these two parameters and histopathology findings was verified. The higher the degree of liver damage (ALT: $r=0.77$ and $p=0.0009$) and the decrease in function (albumin: $r=0.75$ and $p=0.0021$), the larger the fibrosis area found in each animal (Figure 8).

Immunofluorescence

We performed immunofluorescence assays to detect the tTG enzyme. This enzyme catalyzes cross-linking of collagen rendering matrix resistance to degradation (8,14). Normal liver reveals tTG only in perivasculär regions (Figure 9A). Cell-treated and non-treated groups presented intense deposition of the enzyme, suggesting a strong collagen binding in the fibrous septa (Figure 9B and 9C).

Similarly to histomorphometric results, quantification of tTG showed that there was an increase in covalent cross-linking of collagen in cell-treated ($2.25 \pm 0.50\%$) and non-treated ($2.37 \pm 0.28\%$) groups when compared to normal rats ($0.54 \pm 0.04\%$) ($p<0.05$). However, there was no significant difference between the cell-treated and non-treated groups (Figure 9D).

Discussion

The use of BMC transplantation as an alternative therapy for hepatic diseases has been widely studied (31,38,44). Recently two studies have used BMC injection to prevent liver damage induction and described parenchyma remodeling after a single injection of BMCs (39,51).

Considering these observations, our main goal was to verify whether repeated BMC injections would be more effective than a single injection of BMC as a preventive cell-based therapy for chronic hepatic disease. In this regard, the present study is the first to report use of repeated preventive cell infusions with BMC in chronic liver disease.

To date specific mechanisms on how BMC contributes to tissue regeneration have not been elucidated, but recent reports have shown that BMCs can contribute to tissue remodeling by expressing and releasing matrix metalloproteases (11,13,38). This observation is important because it bears relevance to cirrhosis resolution.

Although some groups have used alternative routes for BMC infusion (2,24,35), most of them use systemic transplantation through tail vein (13,39,44). An important question is how effective is the tail vein route in delivering cells to the liver. We examined this using Technetium-99m labeled BMCs. Our results show that these cells predominantly migrate to the liver thus validating the tail vein route for liver cell therapy in rats. It is noteworthy that tail injection of the same cell fraction in a rat model of myocardial infarction results in detection of very low levels of radioactivity in the heart and other organs highly irrigated (unpublished results). Radioisotope labeling, however, cannot reveal engraftment of the injected cells since technetium has a short half-life. Our data, however, are in accord with other studies which

demonstrate homing and retention of bone marrow derived cells into the liver after transplant (13,26,39).

Cellular therapy in liver diseases remains a controversial subject. While some articles demonstrate a good potential of bone marrow derived cell therapy in liver diseases (11,26,31,39,50,51), others show no efficacy for this type of therapy (2,3,15,22,35). Furthermore, there are controversies regarding the type of bone marrow cell sub-population, which is more effective for cellular therapy. Lagasse and co-workers (2000) and Zhan and co-workers (2006) reported that hematopoietic stem cells (HSCs) differentiate into hepatocytes *in vivo* (19,50). In 2004, Sai-Nan Shu and co-workers reported hepatic differentiation capability of mesenchymal stem cells (MSCs) and HSCs (41). Recent studies have suggested that MSCs are more relevant to hepatic plasticity and regeneration (20,21,24), although this has not been reproduced by other studies (23,27). Recently, Nakamura et al have evaluated endothelial progenitor cells obtaining good results not only with single but with repeated cell injections in a liver fibrosis rat model (26). In addition, there are successful studies using hepatocyte transplantation in models of liver diseases (28,32,43). Yet, the use of hepatocytes for transplantation bears the same problem as whole organ transplantation; i.e. donor shortage. Given the controversy about the ideal marrow cell type, the rather inexpensive processing of mononuclear cells anticipating a clinical use, and given that most clinical trials performed to date use the bone marrow mononuclear fraction as a source of stem cells in cell transplantation (25,33,45) we have opted to use this fraction in the present study.

Our results show that repeated infusions of BMCs during the course of cirrhosis induction is not able to protect the liver from the damaging agents. These

results are in contrast to those reported by Sakaida et al. (39) and Zhao et al. (51), who used cell therapy models similar to the one used here. Possible explanations for the opposite results concern the cell type and duration of the exposure to the insulting agent (Sakaida et al. used only CCl₄ and for a total time of 8 weeks) as well as the cell type used (Zhao et al. used MSCs).

During cirrhosis development there is a malfunction of the collagen synthesis/degradation system, and synthesis of extracellular matrix profibrotic elements is extremely exacerbated (9,12,14). Based on our findings in a model of cardiac Chagas disease (42), where BMCs were able to reduce inflammation and fibrosis of the infected hearts we expected to see a similar reduction of fibrosis in the liver. Unfortunately, that was not the case. Additionally, the injured hepatic tissue showed augmentation of collagen cross-linking by tTG action (8,14,49). We verified that tTG were not reduced at the end of the injury period in the cell treated group, thus indicating that BMC did not contribute to reduction of collagen cross-linking that could provide acceleration of fibrolysis after the injury period. This is also true given that liver fibrosis has been associated with bone marrow derived cells in at least three independent reports (6,16,37).

One could argue that BMCs were unable to contribute to liver disease resolution because the transplanted cells had been functionally impaired by being exposed to the same toxic environment as the hepatic cells. In order to test this hypothesis, we performed experiments with delivery of cells after injury was established and when insulting agents had been discontinued. Once again, BMCs were unable to alter chronic liver disease normal progression.

Our results show that repeated cell infusions with BMCs does not generate benefits during continuous liver aggression in a rat model. In addition, after cirrhosis has been established mononuclear cell therapy does not improve liver function or structure more than spontaneous recovery. The clinical implication is, if an efficacious cell therapy is to be found for chronic liver disease, specific stem cell types present in the bone marrow should be tested and action mechanisms should be elucidated. We are currently investigating the potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow in liver regeneration.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mr. Kevin W. Brady and Mr. Bruno Gouvea for reviewing the manuscript.

Grants

Research supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES-MEC).

References

1. Butt, A. A. Hepatitis C virus infection: the new global epidemic. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 3:241–249; 2005.
2. Cantz, T.; Sharma, A. D.; Jochheim-Richter, A.; Arseniev, L.; Klein, C.; Manns, M. P.; Ott, M. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant.* 13:659–666; 2004.
3. Di Campli, C.; Piscaglia, A. C.; Giulante, F.; Rutella, S.; Bonanno, G.; Zocco, M. A.; Ardito, F.; Nuzzo, G.; Mancuso, S.; Leone, G.; Gasbarrini, G.; Pola, P.; Gasbarrini, A. No Evidence of Hematopoietic Stem Cell Mobilization in Patients Submitted to Hepatectomy or in Patients with Acute or Chronic Liver Failure. *Transplant. Proc.* 37:2563–2566; 2005.
4. Dolber, P. C.; Spach, M. S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J. Histochem. Cytochem.* 41:461–469; 1993.
5. Ferrari, G.; Cusella-De Angelis, G.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528–1530; 1998.
6. Forbes, S.; Russo, F.; Rey, V.; Burra, P.; Rugge, M.; Wright, N. A.; Alison, M. R. A Significant Proportion of Myofibroblasts are of Bone Marrow Origin in Human Liver Fibrosis. *Gastroenterology* 126:955–963; 2004.

7. Fukuhara, S.; Tomita, S.; Nakatani, T.; Ohtsu, Y., Ishida, M.; Yutani, C.; Kitamura, S. G-CSF Promotes Bone Marrow Cells to Migrate Into Infarcted Mice Heart, and Differentiate Into Cardiomyocytes. *Cell Transplant.* 13:741–748, 2004.
8. Grenard, P.; Bresson-Hadni, S.; El Alaoui, S.; Chevallier, M.; Vuitton, D. A. ; Ricard-Blum, S. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. *J. Hepatol.* 35:367–375; 2001.
9. Gutiérrez-Ruiz, M. C.; Gómez-Quiroz, L. E. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int.* 27:434–439; 2007.
10. Gutfilen, B.; Rossini, A.; Martins, F. P. P.; Fonseca, L. M. B. Tc-99m-leukocytes- Is it an intracellular labeling? *J. Clin. Lab. Immunol.* 51:1–7; 1999.
11. Higashiyama, R.; Inagaki, Y.; Hong, Y. Y.; Kushida, M.; Nakao, S.; Niioka, M.; Watanabe, T.; Okano, H.; Matsuzaki, Y.; Shiota, G.; Okazaki, I. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45:213–222; 2007.
12. Iredale, J. P.; Benyon, R. C.; Pickering, J.; McCullen, M.; Northrop, M.; Pawley, S.; Hovell, C.; Arthur, M. J. Mechanisms of Spontaneous Resolution of Rat Liver Fibrosis. Hepatic Stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors. *J. Clin. Invest.* 102:538–549; 1998.
13. Ishikawa, T.; Terai, S.; Urata, Y.; Marumoto, Y.; Aoyama, K.; Murata, T.; Mizunaga, Y.; Yamamoto, N.; Nishina, H.; Shinoda, K.; Sakaida, I. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation

synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res.* 327:463–470; 2007.

14. Issa, R.; Zhou, X.; Constandinou, C. M.; Fallowfield, J.; Millward-Sandler, H.; Gaca, M. D. A.; Sands, E.; Suliman, I.; Trim, N.; Knorr, A.; Arthur, M. J. P.; Benyon, C.; Iredale, J. P. Spontaneous Recovery From Micronodular Cirrhosis: Evidence for Incomplete Resolution Associated With Matrix Cross-Linking. *Gastroenterology* 126:1795–1808; 2004.
15. Kanazawa, Y.; Verma, M. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 30:100 Suppl 1:11850–11853; 2003.
16. Kisseeleva, T.; Uchinami, H.; Feirt, N.; Quintana-Bustamante, O.; Segovia, J.; Schwabe, R.; Brenner, A. Bone marrow-derived Fibrocytes Participate in Pathogenesis of Liver Fibrosis. *J. Hepatol.* 45:429–438; 2006.
17. Kotton, D. N.; Ma, B. Y.; Cardoso, W. M.; Sanderson, E. A.; Summer, R. S.; Williams, M. C.; Fine, A. Bone Marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128:5181–5188; 2001.
18. Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S. J. Multi organ, multi lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369–377; 2001.
19. Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I. L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6:1229–1234; 2000.

20. Lange, C.; Bassler, P.; Lioznov, M. V.; Bruns, H.; Kluth, D.; Zander, A. R.; Fiegel, H. C. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplantation Proc.* 37:276–279; 2005.
21. Lange, C.; Bassler, P.; Lioznov, M. V.; Bruns, H.; Kluth, D.; Zander, A. R.; Fiegel, H. C. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J. Gastroenterol.* 11:4497–4504; 2005.
22. Lian, G.; Wang, C.; Teng, C.; Zhang, C.; Du, L.; Zhong, C.; Miao, C.; Ding, M.; Deng, H. Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes in vitro. *Exp. Hematol.* 34:348–358; 2006.
23. Lu, P.; Blesch, A.; Tuszyński, M. H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 77:174–191; 2004.
24. Luk, J. M.; Wang, P. P.; Lee, C. K.; Wang, J. H.; Fan, S. T. Hepatic potential of bone marrow stromal cell: Development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J. Immunol. Methods* 305:39–47; 2005.
25. Nagamura-Inoue, T.; Tojo, A.; Ikebuchi, K.; Takahashi, S.; Ogura, H.; Shindoh, E.; Nagamura, F.; Uemura, N.; Irie, S.; Setoyama, M.; Tajika, K.; Nakayama, M.; Nagayama, H.; Kobayashi, Y.; Shirafuji, N.; Sato, N.; Okamoto, S.; Ozawa, K.; Tani, K.; Asano, S. Autologous bone marrow transplantation for patients with advanced chronic myelogenous leukemia. *Int. J. Hematol.* 66:493–503; 1997.
26. Nakamura, T.; Torimura, T.; Sakamoto, M.; Hashimoto, O.; Taniguchi, E.; Inoue, K.; Sakata, R.; Kumashiro, R.; Murohara, T.; Ueno, T.; Sata, M. Significance and

Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cell Transplantation in a Cirrhotic Liver Rat Model. *Gastroenterology* 133:91–107; 2007.

27. Neuhuber, B.; Gallo, G.; Howard, L.; Kostura, L.; Mackay, A.; Fischer, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J. Neurosci. Res.* 77:192–204; 2004.
28. Ochenashko, O. V.; Volkova, N. A.; Mazur, S. P.; Somov, A. Y.; Fuller, B. J.; Petrenko, A. Y. Cryopreserved fetal liver cell transplants support the chronic failing liver in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Cell Transplant.* 15:23–33; 2006.
29. Okamoto, R.; Yajima, T.; Yamazaki, M.; Kanai, T.; Mukai, M.; Okamoto, S.; Ikeda, Y.; Hibi, T.; Inazawa, J.; Watanabe, M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat. Med.* 8:1011–1017; 2002.
30. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701–705; 2001.
31. Oyagi, S.; Hirose, M.; Kojima, M.; Okuyama, M.; Kawase, M.; Nakamura, T.; Ohgushi, H., Yagi, K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J. Hepatol.* 44:742–748; 2006.
32. Park, S. M.; Vo, K.; Lallier, M.; Cloutier, A. S.; Brochu, P.; Alvarez, F.; Martin, S. R. Hepatocyte transplantation in the long evans cinnamon rat model of Wilson's disease. *Cell Transplant.* 15:13–22; 2006.

33. Perin, E. C.; Dohmann, H. F.; Borojevic, R.; Silva, S. A.; Sousa, A. L.; Silva, G. V.; Mesquita, C. T.; Belem, L.; Vaughn, W. K.; Rangel, F. O.; Assad, J. A.; Carvalho, A. C.; Branco, R. V.; Rossi, M. I.; Dohmann, H. J.; Willerson, J. T. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 110:II213–II218; 2004.
34. Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S.; Goff, J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168–1170; 1999.
35. Popp, F. C.; Slowik, P.; Eggenhofer, E.; Renner, P.; Lang, S. A.; Stoeltzing, O.; Geissler, E. K.; Piso, P.; Schlitt, H. J.; Dahlke, M. H. No Contribution of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Liver Regeneration in a Rat Model of Prolonged Hepatic Injury. *Stem Cells* 25:639–645; 2007.
36. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey JR., G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 123:1939–1951; 1993.
37. Russo, F. P.; Alison, M. R.; Bigger, B. W.; Amofah, E.; Florou, A.; Amin, F.; Bou-Gharios, G.; Jeffery, R.; Iredale, J. P.; Forbes, S. J. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 130:1807–1821; 2006.
38. Sakaida, I.; Terai, S.; Nishina, H.; Okita, K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med. Mol. Morphol.* 38:197–202; 2005.

39. 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* 40:1304–1311; 2004.
40. Schwartz, R. E.; Reyes, M.; Koodie, L.; Jiang, Y.; Blackstad, M.; Lund, T.; Lenvik, T.; Johnson, S.; Hu, W.; Verfaillie, C. M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109:1291–1302; 2002.
41. Shu, S.; Wei, L.; Wang, J.; Zhan, Y.; Chen, H.; Wang, Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J. Gastroenterol.* 10:2818–2822; 2004.
42. Soares, M. B.; Lima, R. S.; Rocha, L. L.; Takyia, C. M.; Pontes-de-Carvalho, L.; Campos de Carvalho, A. C.; Ribeiro-dos-Santos, R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Pathol.* 164:441–447; 2004.
43. Strom, S. C.; Bruzzone, P.; Cai, H.; Ellis, E.; Lehmann, T.; Mitamura, K.; Miki, T. Hepatocyte transplantation: clinical experience and potential for future use. *Cell Transplant.* 15:S105–110; 2006.
44. Terai, S.; Sakaida, I.; Nishina, H.; Okita, K. Lesson from the GFP/CCl₄ model—translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 12:203–207; 2005.

45. 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* 24:2292–2298; 2006.
46. Theise, M. D.; Nimmakayalu, M.; Gardner, R.; Illei, P. B.; Morgan, G.; Teperman, L.; Henegariu, O.; Krause, D. S. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32:11–16; 2000.
47. Voigt, M. D. Alcohol in hepatocellular cancer. *Clin. Liver Dis.* 9:151–169; 2005.
48. Williams, R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 44:521–526; 2006.
49. Wu, J.; Zern, M. A. Tissue transglutaminase, a key enzyme involved in liver diseases. *Hepatol. Res.* 29:1–8; 2004.
50. Zhan, Y.; Wang, Y.; Wei, L.; Chen, H.; Cong, X.; Fei, R.; Gao, Y.; Liu, F. Differentiation of Hematopoietic Stem Cells into Hepatocytes in Liver Fibrosis in Rats. *Transplant. Proc.* 38:3082–3085; 2006.
51. Zhao, D. C.; Lei, J. X.; Chen, R.; Yu, W. H.; Zhang, X. M.; Li, S. N.; Xiang, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J. Gastroenterol.* 11:3431–3440; 2005.

Legends

Figure 1: Representative image of a ^{99m}Tc -labeled BMC scan three hours after administration. ^{99m}TC -BMC uptake in liver, kidneys and bladder is shown by the white areas as indicated by the arrows. Color code indicating intensity of measured radiation is shown to the right.

Figure 2: Measurement of ALT and albumin in control and age matched rats after 15 weeks of cirrhosis induction. ALT (A) and albumin (B) levels were not statistically different between cell-treated and non-treated groups; however both groups differed from normal values. (ANOVA, followed by Turkey's post test, *** $p<0.001$ when compared to control group).

Figure 3: Biochemical data in the post injury cell infusion group. Measurement of ALT (A) and albumin (B) in post injury cell infusion group did not show any differences between cell-treated and non-treated groups (ANOVA, followed by Turkey's post test, ***a $p<0.001$ when compared to normal group; ***b $p<0.001$ and **b $p<0.01$ when compared to values found after 15 weeks of chronic liver injury).

Figure 4: Presence of ascitis in both groups (cell-treated and non-treated) (A). The syringe shows ascitis fluid (B). Ultrasound image illustrates a small cirrhotic liver with a great amount of ascites (C). Quantification of ascitis occurrence in both groups (cell-treated and non-treated) (D).

Figure 5: Quantification of portal vein caliber by ultrasound (A). The cell-treated and non-treated groups demonstrated larger portal vein caliber when compared to the

age matched control group, but there was no significant difference between them (ANOVA, followed by Turkey's post-test, *** $p<0,001$). Ultrasound image illustrates a dilated and tortuous portal vein (arrow) (B).

Figure 6: Histological alterations observed after 15 weeks of cirrhosis induction. In both groups (cell treated and non-treated) animals had clear evidence of macronodular cirrhosis after 15 weeks of induction. Liver surface was extremely irregular with multiple nodules (white arrow) and had a rigid consistency (A). H&E histological analysis (magnification 10X) shows liver cirrhosis, characterized by global loss of normal parenchyma architecture and formation of nodules separated by collagen septa containing some portal inflammatory infiltrate (black arrows) and lipofuscin resulting from Kupffer cells activity (black head arrows) (B and C). The same histopathological findings were seen in cell-treated and non-treated groups. Sirius red staining (magnification 10X) shows intense collagen deposition forming thick septa interconnecting regenerative nodules (D and E) after 15 weeks of cirrhosis induction. Scale bar: 100 μm .

Figure 7: Collagen quantification (collagen / total area) using the Image-Pro software. There was no statistical difference between cell-treated and non-treated groups, but both differed from control group in preventive cell infusions (A) and post injury cell infusion groups (B) (ANOVA, followed by Turkey's post test, *** $p<0.001$ and ** $p<0.01$ when compared to normal group).

Figure 8: A direct relation between blood parameters and histopathology findings was verified. The level of liver damage, represented by ALT, and the loss of liver

function, represented by albumin, had a linear relation to the area of fibrosis (ALT n =15; r=0.77 and p=0.0009); (Albumin n=14; r= 0.75; p=0.0021).

Figure 9: Immunoassay (magnification 10X) showing collagen cross-linking. (A) – Normal group shows presence of collagen cross-linking only around vessels. (B and C) – Septal staining indicates increase in collagen cross-linking in non-treated (B) and cell-treated groups (C). (D) - Morphometric analysis showed that there was an increase in covalent cross-linking of collagen in both cell-treated and non-treated groups when compared to control rats. (ANOVA, followed by Turkey's post-test, *p<0.05 when compared to control group). Scale bar: 100 µm.

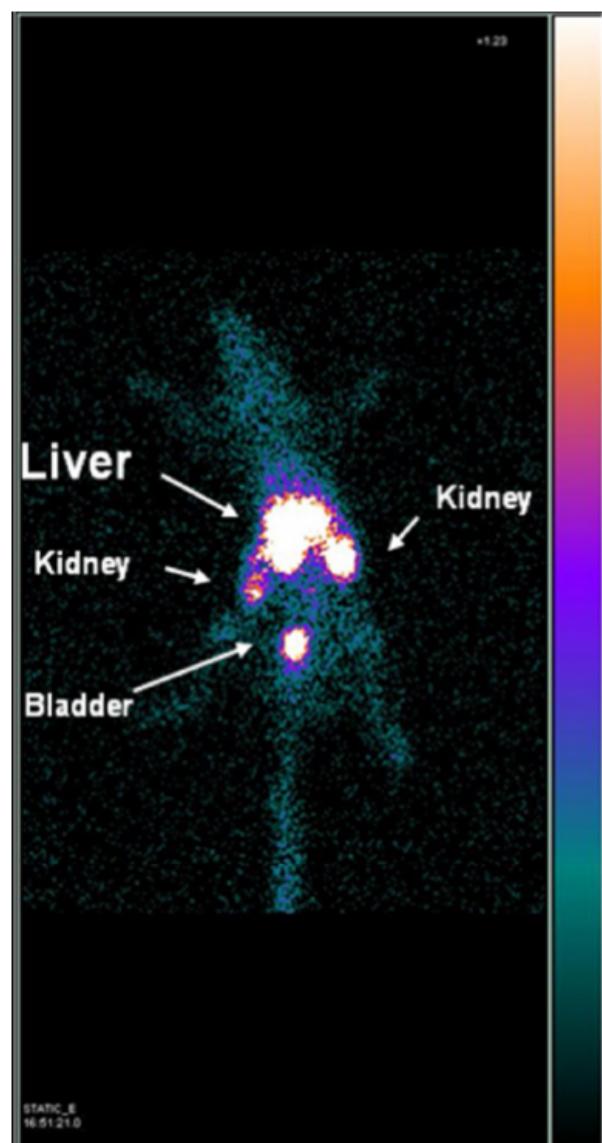


FIGURE 1

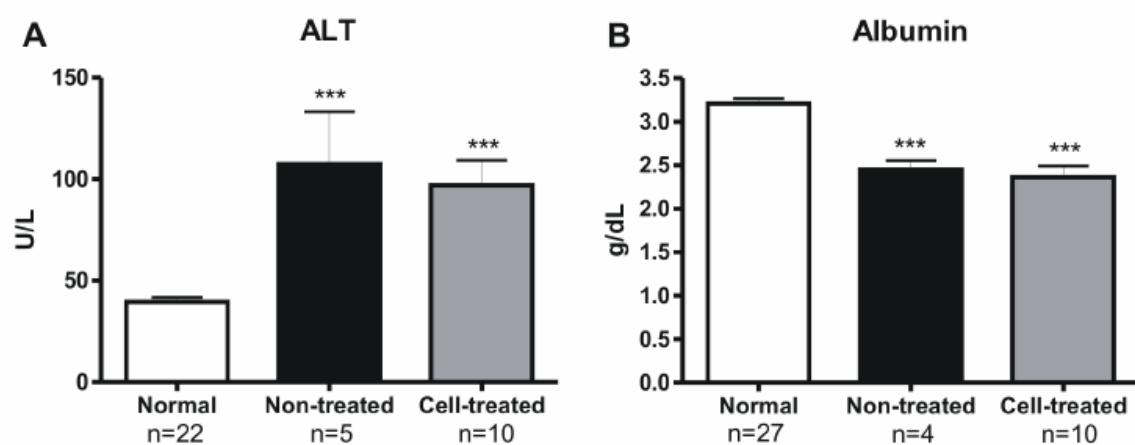
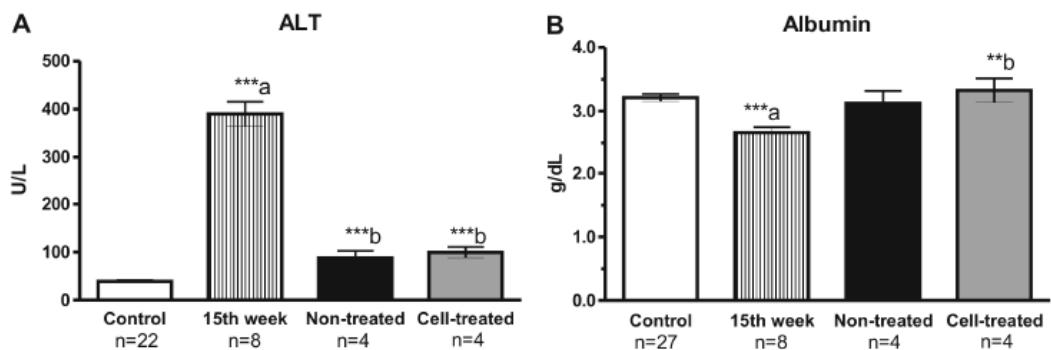
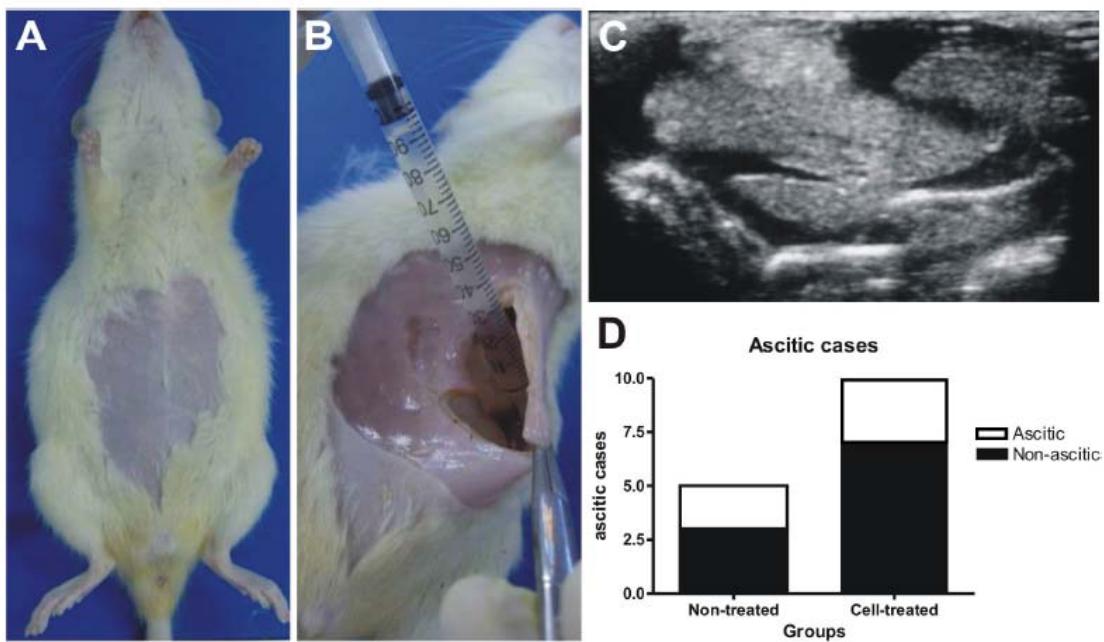


FIGURE 2

**FIGURE 3****FIGURE 4**

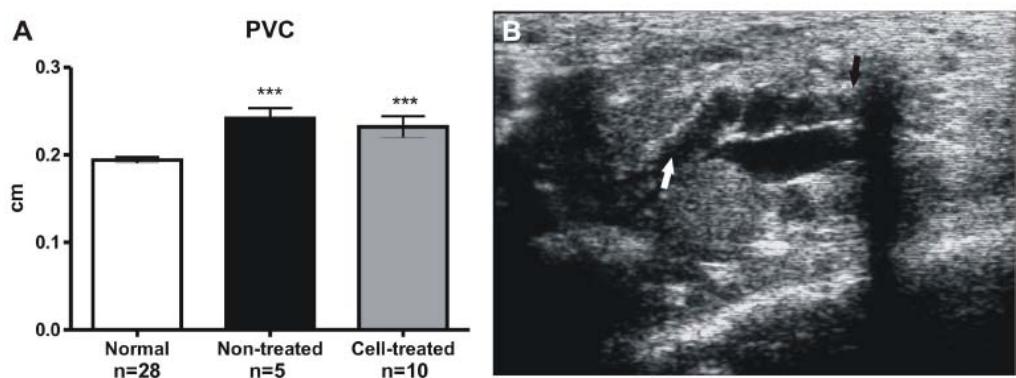


FIGURE 5

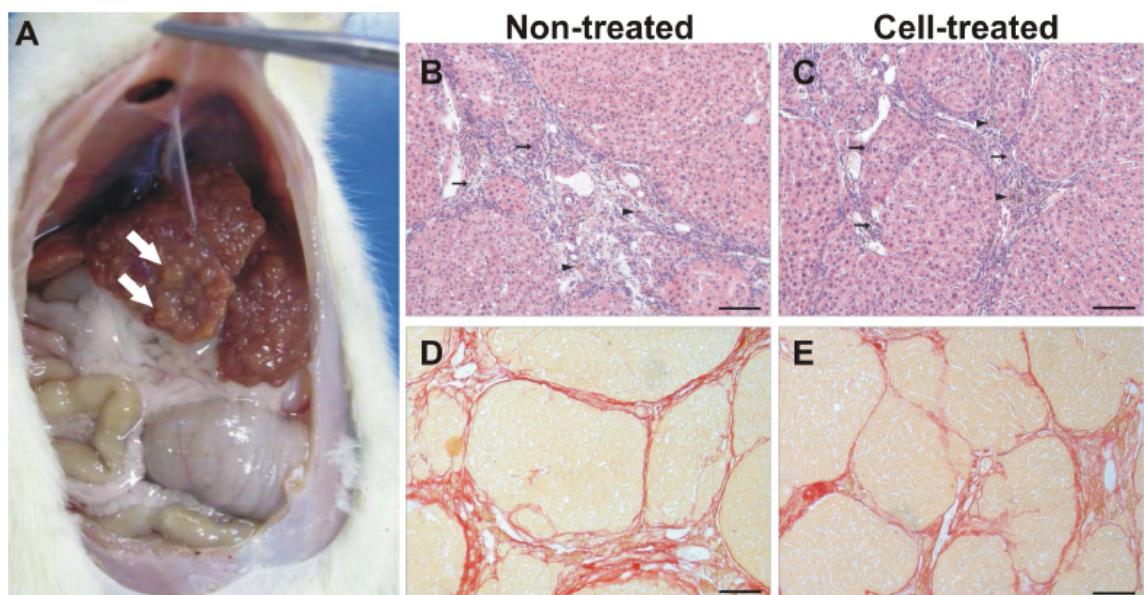


FIGURE 6

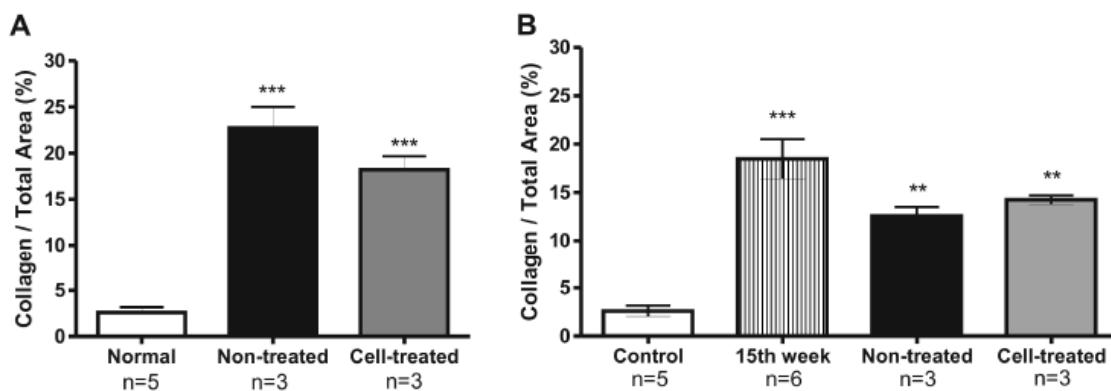
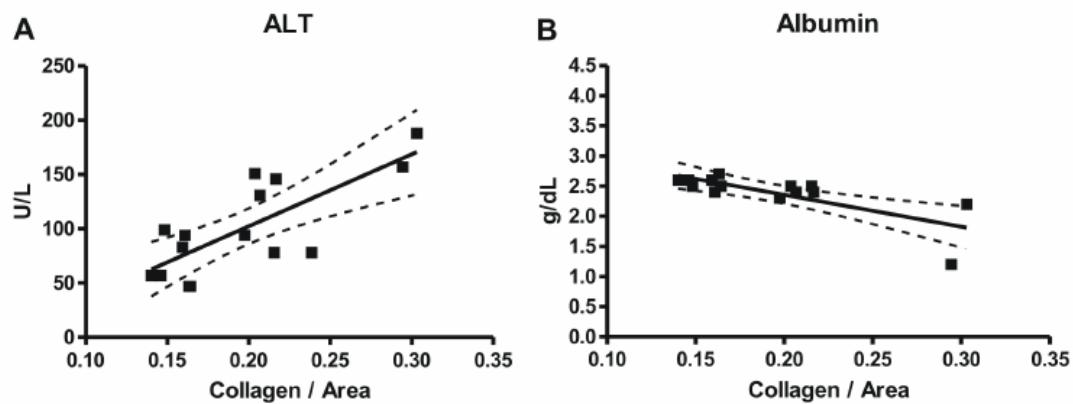
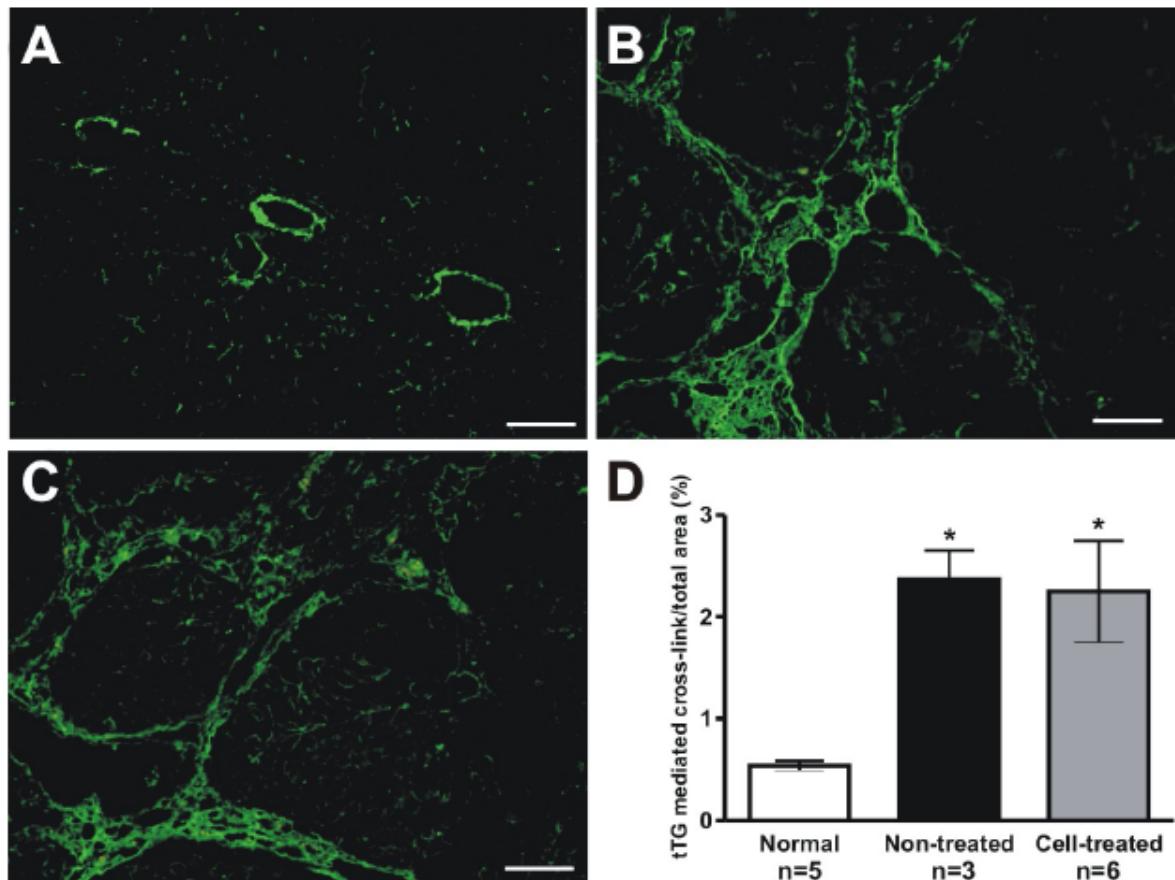


FIGURE 7

**FIGURE 8****FIGURE 9**

8.3. Tissue transglutaminase2 persistence contributes to inefficient collagen degradation. Artigo submetido para publicação na revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research em janeiro de 2008.

Juliana V. Dias^{1*}; Bruno D. Paredes^{2*}; Luiz F. Q. Mesquita²; Adriana B. Carvalho²; Eliene O. Kozlowski³; Andréia S. Lessa¹; Christina M. Takiya⁴; Célia M. C. Resende¹; Henrique S. M. Coelho¹; Antonio C. Campos de Carvalho²; Guilherme F. M. Rezende¹; Regina C.S. Goldenberg².

¹Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina UFRJ, HUCFF, 9º andar, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil CEP 21949-900; ²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho UFRJ, CCS, Bloco G, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil CEP 21949-900; ³Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, HUCFF, 4º andar, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil CEP 21941-590; ⁴Instituto de Ciências Biomédicas UFRJ, CCS, Bloco F, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, Brasil.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Regina C.S. Goldenberg, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Av.Carlos Chagas Filho, 373. Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco G / sala G2-053 Cidade Universitária - CEP: 21941-902 Rio de Janeiro, RJ - Brasil.
Telephone: 55-21-2562.6559 Fax: 55-21-2280.8193. Email: rcoeli@biof.ufrj.br

Running Head: Tissue transglutaminase 2 contributes to fibrosis stabilization.

Support: CAPES-MEC, MCT-PRONEX, FAPERJ, CNPq and Instituto do Milênio de Bioengenharia Tecidual.

ABSTRACT

Background/Aims: Our aim was to evaluate modifications promoted in the extracellular matrix by cirrhosis induction and the effect of injury interruption in tissue remodeling. **Methods:** Ethanol and carbon tetrachloride were administered over 15 weeks to induce cirrhosis (n=11). After that period, ultrasound was performed to evaluate portal vein caliber and liver parenchyma echogenicity. Five animals were sacrificed and 6 animals were followed for 8 more weeks, when they were also sacrificed. Liver sections were stained with Hematoxilin&Eosin and Sirius Red.

Histomorphometry and hydroxyproline assays determined collagen content. Immunofluorescence evaluated collagen types I and III and tissue transglutaminase

2. Results: After 15 weeks of injury, ultrasonography showed dilation of portal vein and coarse liver echogenicity. Histopathology showed regenerative nodules and fibrous septa. Total collagen content was increased in cirrhotic animals in histomorphometry and hydroxyproline assays. Collagens types I and III and tissue transglutaminase contents were also increased. Eight weeks after insult was interrupted, ultrasonographic parameters, collagen content and tissue transglutaminase remained altered, with no difference when comparing to 15 weeks of aggression. **Conclusion:** Liver insult resulted in cirrhosis. The presence of tissue transglutaminase in fibrotic septa seems to stabilize collagen and sustain cirrhosis for at least 8 weeks after insult withdrawal.

**** Word count in abstract: 200**

Keywords: Cirrhosis, collagen, tissue transglutaminase.

INTRODUCTION

Hepatic fibrosis is an early finding in chronic liver injury characterized by failure of degradation and excessive synthesis of extracellular matrix (ECM) components, mostly collagens type I and III. Persistence of the insult disrupts normal hepatic architecture, leading to development of regenerative nodules and vascular dysfunction, configuring cirrhosis stage (1). Hepatic cirrhosis was described as an irreversible disease, which results from the incapacity of the wounded liver to remodel fibrosis. However, experimental studies with animals and humans have recently defied this concept (2).

Animal models of hepatic cirrhosis use carbon tetrachloride (CCl_4) extensively as a hepatotoxic agent to evaluate liver injury and recovery (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Spontaneous remodeling of extracellular matrix has been reported after cessation of CCl_4 intoxication leading to macronodular cirrhosis. (10, 8, 9).

The association of CCl_4 with ethanol potentializes toxicity of the former, since it increases activation of cytochrome P450, the enzymatic complex responsible for CCl_4 metabolism (11). This reaction leads to production of oxidative radicals that cause lipid peroxidation and, consequently, hepatotoxic injury (5). Ethanol also induces synthesis of type I collagen fibrils (12), inhibition of hepatocyte proliferation (13), increased expression of tissue transglutaminase (tTG) and exacerbation of its activity in hepatic stellate cells (13,14). Tissue transglutaminase belongs to a large family of enzymes that catalyze Ca^{2+} -dependent acryl transfer reactions between the γ -carboxamide group of peptide-bound glutamine and the ε -amino group of peptide bound to lysine. The reaction leads to formation of ε - (γ -glutamyl) lysine cross-links that contributes to extracellular matrix protein stabilization (such as collagen)

providing resistance to proteolytic degradation by matrix metalloproteases - MMPs (15; 16).

Our group associated CCl₄ to an alcoholic liquid diet to evaluate changes in extracellular matrix components promoted by chronic liver injury and after withdrawal of these toxic agents. Although histological analysis is still the gold standard method for diagnosis of hepatic cirrhosis, we used ultrasound examination to compare a non-invasive diagnostic method with histology. The purpose of this paper is to describe ultrasonographic and histopathologic findings in the liver of intoxicated animals and show that the presence of tTG stabilizes extracellular matrix and sustains cirrhosis features for at least 8 weeks after interruption of the hepatic injury induction.

MATERIAL AND METHODS

Animals

This investigation conforms to "The Guide for Care and Use of Laboratory Animals" [DHHS Publication No. (NIH) 85-23, revised 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892] and was approved by the authors institutional animal committee (protocol no. 021)

Female Wistar rats were obtained from Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF – Rio de Janeiro/Brasil). Animals were housed at controlled temperature (23°C) with daily exposure to a 12:12 light dark cycle.

Chronic liver injury model

Cirrhosis was induced in 11 female Wistar rats (weighting 150 – 200 g) with injections of a 20% solution of CCl₄ (1:5 in olive oil - dose of 0,05ml/kg) associated with an alcoholic liquid diet in accordance to the AIN-93 guidelines (17). Prior to CCl₄ administration, an adaptation phase was performed with a non-alcoholic liquid diet (control diet) administered for one week followed by a second week of ethanol diet. Injections of CCl₄ were performed intraperitonially (i.p.), 3 times per week on alternate days during 15 weeks. At this point five animals were sacrificed. The remaining animals (n=6) returned to the standard chow and water diet and were sacrificed 8 weeks after discontinuation of insult agents. Rats were given *ad libitum* access to liquid diets. A control group, consisting of 7 age and sex matched animals was fed on standard chow (Table 1).

Ultrasound examination

Animals were anesthetized and placed in supine position breathing spontaneously. Thricotomy was performed and a 10MHz linear transducer of a Caris Plus® ultrasound equipment (Esaote, Italy) was used to analyze the portal vein caliber, liver parenchyma echogenicity and the presence of ascitis.

Histology

Animals were sacrificed after 15 weeks of chronic liver injury and 8 weeks after toxic induction interruption. Liver tissue slices were fixed for 5 hours in Bouin's solution followed by overnight 10% buffered formalin solution (pH 7.2) and embedded

in paraffin. Liver samples were sectioned (5 μ m) and stained with H&E and Sirius Red according to standard protocols (18).

Collagen quantification

Liver collagen was measured by morphometric analysis. Sirius Red stained areas were measured in 5 μ m liver sections and collagen content was calculated as a percentage of the total field area examined. Ten fields were randomly photographed and analyzed using Image-Pro Plus 5.0 (MediaCybernetics, USA) image analysis software.

Biochemical determination of liver collagen content was done by hydroxyproline assay as previously described (19). In short, two grams of fresh hepatic tissue of each animal was dehydrated in acetone for two days and dried up for 24 hours at 60°C. Dry tissue samples were mashed, homogenized and stored at 4°C. Ten milligrams of the dry samples were hydrolyzed in HCl 6M for 18 hours at 107°C. Samples were reconstituted with 200 μ L of buffered solution (5% citric acid, 1.2% acetic acid, 12% sodium acetate and 3.4% sodium hydroxide, pH 6.0) 1:10 diluted and incubated with 1mL of chloramine-T (60mM in 50% n-propanol, pH 6.0) for 20 minutes at 38°C. Finally, samples were incubated with 1mL of aldehyde/perchloric acid solution (1M 4-(Dimethylamino)-benzaldehyde in 16% perchloric acid and 60% n-propanol) for 20 min at 60°C. Optical density was read at $\lambda=570\text{nm}$ using a spectrophotometer (GE Healthcare do Brasil, Brazil). Concentration was determined by the linear regression equation of a standard calibration curve of 4-hydroxyproline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Immunofluorescence

Liver tissue was embedded in Tissue-TekTM OCT compound (Sakura, Japan) and preserved at 70°C. Six µm liver samples were sectioned in cryostat at -20°C and fixed in acetone. Indirect immunofluorescence technique was performed using anti-tTG (Stratech Scientific) at 1:40 and anti-collagen types I and III antibodies (CHEMICON International, USA) at 1:30. Secondary antibodies were FITC goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate (ZYMED, USA at 1:50) for tTG and FITC goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugate (ZYMED, USA at 1:50) for collagen type I and III [5, 18]. As control, liver sections were incubated with non immune mouse or rabbit serum instead of antibodies, followed by incubation with secondary antibodies. Quantification of tTG and collagens type I and III was performed by calculating the percent FITC stained area. Ten fields were photographed and analyzed using Image-Pro Plus 5.0 (MediaCybernetics, USA) image analysis software.

Statistical analysis

Significant statistical differences among means were assessed using ANOVA with Tukey's post-test for multiple comparisons. p<0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean ± SD.

RESULTS

Ultrasound assessment

Ultrasound analysis showed an increase in liver echogenicity characterized by extensive coarsened and heterogeneous parenchyma with disorganized hepatic surface after 15 weeks of induction and 8 weeks after intoxication was interrupted which was consistent with the diagnosis of cirrhosis (compare CONTROL to other groups in Figure 1A, 1E, 1I). There was an increase in portal vein caliber (PVC) in groups EtOH+CCl₄ (0.22±0.01; p<0.001) and EtOH+CCl₄/8wR (0.21±0.02; p<0.01) when compared to CONTROL group (0.16±0.02).

Histology

Animals in CONTROL group presented liver macroscopy with a brownish-red color, a smooth surface and elastic consistency (Figure 1B). In microscopy, hepatocytes were radially arranged in plates aligned to sinusoids and converging to centrolobular veins (Figure 1C). Moreover, Sirius-Red only stained portal spaces and centrolobular vessels (Figure 1D).

At the 15th week of induction there was clear evidence of macronodular cirrhosis. Liver surface was extremely irregular with multiple nodules and had a rigid consistency (Figure 1F). Histological analysis showed liver cirrhosis, characterized by global loss of normal parenchymal architecture, and formation of nodules separated by collagenous septa containing some inflammatory infiltrate (Figure 1G). Collagen deposition was intense, forming thick septa interconnecting regenerative nodules (Figure 1H).

After 8 weeks of recovery the EtOH+CCl₄/8wR group presented the same macroscopic and microscopic patterns found in EtOH+CCl₄ group (Figures 1J, K, L) indicating that cirrhosis was sustained after aggression was interrupted.

Collagen quantification

Morphometric analysis of Sirius Red stained areas showed an increase in liver collagen content in groups EtOH+CCl₄ (12.6±2.64; p<0.001) and EtOH+CCl₄/8wR (10.4±1.36; p<0.05) when compared to CONTROL group (2.2±1.21) (Figure 2A).

Hydroxyproline (HYP) is an amino acid found almost exclusively in collagen proteins. Sample concentration of HYP has a direct correlation to the amount of fibrosis in the liver. There was an increase in HYP concentration in EtOH+CCl₄ (1.9±0.035; p<0.001) and EtOH+CCl₄/8wR groups (1.6±0.18; p<0.05) when compared to CONTROL group (1.2±0.17) (Figure 2B).

Immunofluorescence

We performed immunofluorescence assay searching for the presence of tTG in cirrhotic liver. In figure 3A, normal liver shows deposition of tTG only in perivascular regions. Group EtOH+CCl₄, as shown in figure 3B, presented intense deposition of this enzyme. This same pattern was observed in group EtOH+CCl₄/8wR (Figure 3C).

Quantification of the area stained with tTG showed that there was an increase in the deposition of this enzyme in groups EtOH+CCl₄ (66.4±8; p<0.01) and EtOH+CCl₄/8wR (58.8±21; p<0.01) when compared to CONTROL group (7.9±0.8) (Figure 3D).

In order to verify the presence of collagen isotypes, collagens I and III were detected by immunofluorescence. In normal rats, both collagens were detected in

portal spaces and as tiny fibrils in liver lobule (Figures 4A and 4B). After 15 weeks of induction, both types of collagen were deposited, forming hepatic nodules (Figures 4C and 4D). A similar pattern was still observed at the 8th week (after aggression was interrupted) (Figures 4E and 4F).

Collagen quantification showed an increase in both types in groups EtOH+CCl₄ [collagen I (2.5±1.3; p<0.01) and collagen III (1.3±0.2; p<0.05)] and EtOH+CCl₄/8wR [collagen I (1.8±0.06; p<0.05) and collagen III (1.5±0.8; p<0.01)] when compared with CONTROL group [collagen I (0.38±0.11) and collagen III (0.25±0.06)] (Figures 4G and 4F).

DISCUSSION

Hepatic cirrhosis is characterized by failure of degradation and excessive synthesis of the extracellular matrix (ECM). The present study shows that chronic liver injury induced by association of CCl₄ and ethanol leads to hepatic cirrhosis within 15 weeks of administration of these hepatotoxic agents. The presence of cirrhosis was confirmed by parenchyma architectural disruption and nodule formation with intense ECM components deposition defined by total collagen content quantification. These liver alterations persisted for at least 8 weeks after withdrawal of toxic agents. Ultrasonographic findings showed increased liver echogenicity with a coarse pattern and nodular surface indicating a severe tissue alteration which was confirmed by histological results. In addition, dilatation of the portal vein was also sustained after induction was interrupted. Portal vein remodeling is direct related to portal hypertension, a severe complication of liver cirrhosis (20).

Studies using chronic injections of CCl₄ were undertaken to determine spontaneous reversibility of hepatic fibrosis/cirrhosis (6, 8, 21, 9). Following chronic induction by 12 weeks, micronodular cirrhosis was developed and underwent remodeling yielding macronodular cirrhosis 28 days after withdrawal of intoxication (8). In another study, hepatic cirrhosis was established after 16 weeks of CCl₄ administration, and one month after aggression was terminated fibrous septa presented thinning and disruption, associated to even more enlarged regenerative nodules (9). The reversibility seen in these models of chronic liver injury may reflect the well known liver regeneration capability. In our model the combined effect of two hepatotoxic agents, ethanol and CCl₄, seems to surpass the endogenous spontaneous regeneration process, leading to non-reversible injury. It remains to be seen if discontinuation of aggression for periods longer than 8 weeks will result in partial recovery. Although there were no statistical differences between all measured parameters in the EtOH+CCl₄ and EtOH+CCl₄/8wR groups, all values measured in the later group tended to be smaller than in the former. An important issue concerning the reversibility process of cirrhosis is the presence of mature fibrosis areas with broad collagen septa and extensively cross-linked by tTG, an enzyme that stabilizes the ECM, rendering the collagens fibers less sensitive to proteolytic degrading. (22,23). These areas do not undergo remodeling and can represent the limit of matrix reversibility (8).

Collagens type I and III show a three-to-eight fold increase in hepatic injury (24). These proteins are mainly synthesized by hepatic stellate cells (HSC) when these are activated. Type I procollagen expression in activated HSC is stimulated when these cells are exposed to ethanol in culture (12). Both collagens types are substrates for tTG (25). Our experiment associating ethanol and CCl₄ demonstrated

a high amount of tTG localized mainly at fibrous septa at the end of 15 weeks of intoxication, a period when cellular chronic injuries are at the highest level and tTG is linked to extracellular matrix.

We believe that tTG presence 8 weeks after chronic liver injury discontinuation can contribute to the elevated percentage of collagens type I and type III observed at the same time point in our study. Collagen cross-linking makes this molecule more resistant to collagenase degradation, therefore inhibiting fibrosis remodeling. Moreover, persistent presence of tTG after withdrawal of toxic agents might delimit a point of no return for hepatic cirrhosis.

So, this work shows that tTG can be present after discontinuation of toxic agents, which might contribute to collagen resistance and therefore to fibrosis remodeling.

REFERENCES

- 1 - Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(4):1100.
- 2 - Iredale J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Inves* 2007;117:539–548.
- 3 - Cameron GR, Karunaratne WAE. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathology Bacteriology* 1936;42:1-21.
- 4 - McLean EK, McLean AE, Sutton PM. Instant cirrhosis. An improved method for producing cirrhosis of the liver in rats by simultaneous administration of carbon tetrachloride and phenobarbitone. *Br J Exp Pathol* 1969;50(5):502-506.

- 5 - Hall PD, Plummer JL, Ilsley AH, Cousins MJ. Hepatic fibrosis and cirrhosis after chronic administration of ethanol and "low-dose" carbon tetrachloride vapor in the rat. *Hepatology* 1991;13(5):815-819.
- 6 - Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S *et al.*, Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102(3):538-549.
- 7 - Brandão CG, Ferreira HH, Piovesana H, Polimeno NC, Ferraz JG, de Nucci G, *et al.*, Development of an experimental model of liver cirrhosis in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27(12):987-990.
- 8 - Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, *et al.*, Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004;126(7):1795-1808.
- 9 - Vinicius ID, Baptista AP, Barbosa AA, Andrade ZA. Morphological signs of cirrhosis regression. Experimental observations on carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis of rats. *Pathol Res Pract* 2005;201(6):449-456.
- 10 - Perez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;112-120.
- 11 - Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997;257(1):59-84.
- 12 - Kato J, Sato Y, Inui N, Nakano Y, Takimoto R, Takada K *et al.*, Ethanol induces transforming growth factor-alpha expression in hepatocytes, leading to stimulation of

collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27(8):58S-63S.

13 - Wu J, Liu SL, Zhu JL, Norton PA, Nojiri S, Hoek JB *et al.*, Roles of tissue transglutaminase in ethanol-induced inhibition of hepatocyte proliferation and alpha 1-adrenergic signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275(29):22213-22219.

14 - D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44(1):217-231.

15 - Issa R, Zhou X, Trim N, Millward-Sadler H. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J*. 2003 Jan;17(1):47-9.

16 - Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-56. Review.

17 - Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey Jr., G.C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *Journal of Nutrition* 1993;123(11): 1939 – 1951.

18 - Dolber PC, Spach MS. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 1993;41(3):465-469.

19 - Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967;18(2):267-273.

- 20 - Sherlock S, Dooley J. The portal venous system and portal hypertension. In: Sherlock S, Dooley J, editors. Diseases of the Liver and Biliary System, 11th ed. Williston: Blackwell Publishing Ltd. 2002;152-172.
- 21 - Zhou X, Hovell CJ, Pawley S, Hutchings MI, Arthur MJ, Iredale JP *et al.*, Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int.* 2004; 24(5):492-501.
- 22 - Johnson TS, Skill NJ, El Nahas AM, Oldroyd SD, Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 2146–2157.
- 23 - Desmet VJ. Comments on cirrhosis reversal. *Dig Liver Dis* 2005;37 909–916.
- 24 - Sherlock S, Dooley J. Hepatic Cirrhosis. In: Sherlock S, Dooley J, editors. Diseases of the Liver and Biliary System, 11th ed. Williston: Blackwell Publishing Ltd. 2002;368-377.
- 25 - Verderio EA, Johnson T, Griffin M. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino Acids* 2004; 26(4):387-404.

FIGURE CAPTIONS:

Figure 1 – Ultrasound images (A, E, I), histology (B-D, F-H, J-L) and measure of vein portal caliber (M, N, O). Normal liver: (A) Ultrasonographic images illustrate homogeneous liver echotexture with regular contours. (B) Macroscopy of normal liver. Notice smooth surface and brownish-red color. (C) - Microscopy of normal liver (H&E 200x). The parenchyma is homogeneous showing hepatocytes (arrowheads)

with round nuclei and sinusoids with radial arrangement. **(D)** - Sirius Red staining showing collagen in red. Deposition occurs only in vessels (portal triad – arrow; central vein – arrowhead, 40x). **After 15 weeks of induction:** **(E)** Ultrasonographic images illustrate coarse liver echotexture **(F)** Liver cirrhosis: irregular surface and multiple nodules (arrows). **(G)** Microscopy shows modification of liver normal structure, with inflammatory infiltrate (arrowheads) and tissue necrosis (H&E 200x). **(H)** Sirius Red staining shows deposition of collagen in thick septus, forming regeneration nodules (100x). **Eight weeks after chronic injury interruption:** **(I)** Ultrasound shows the same pattern as in 15 weeks of induction with a diffuse coarse liver echotexture. **(J)** Macroscopy showing nodules in liver surface. **(K)** Microscopy shows thick fibrous septa (arrowheads) and **(L)** regenerative nodules as seen before. **Portal Vein Caliber (PVC):** **(M)** Ultrasound images show normal portal vein caliber (arrows), **(N)** dilated and tortuous portal vein representative of both intoxicated groups (arrows) and **(O)** quantification of PVC showing increase in vein portal caliber (0,24 cm) in both groups intoxicated with ethanol and CCl₄ compared to CONTROL group (14mm).

Figure 2 – Sirius Red morphometric analysis (A) show that chronic induction by 15 weeks leads to an increase in the amount of fibrosis when compared to CONTROL group. The content of fibrosis was sustained by 8 weeks after interruption of induction. **Hydroxyproline assay (B)** showed an increase in liver collagen content after 15 weeks of cirrhosis induction and 8 weeks after interruption.

Figure 3 – Qualification (A-C) and quantification (D) of tTG. **(A)** Normal group shows presence of tTG only around vessels. **(B)** Septal staining indicate increase of

this enzyme. (C) Hepatic nodules are still stained 8 weeks after interruption of ethanol and CCl₄, indicating that tTG is still present after this period. (D) Morphometrical analysis showed that there was increase in tTG enzyme in all groups when compared to CONTROL group.

Figure 4 – Immunofluorescence against collagen type I (A, C, E - 100x) and collagen type III (B, D, F - 100x). Collagen type I (A) and type III (B) detection in normal hepatic parenchyma. After intoxication for 15 weeks (EtOH+CCl₄) both collagen types (C and D) presented augmented detection. This pattern of staining remained in group with interrupted chronic liver injury (EtOH+CCl₄/8wR) (E and F). Fluorescence morphometric analysis of collagen type I (G) and type III (F) shows augmentation of both collagen types at 15 weeks of intoxication and 8 weeks after interruption of chronic liver injury.

Table 1 – Experimental groups

| | |
|---------------------------------|---|
| CONTROL | Standard rat chow and filtered water diet; n = 7 |
| EtOH+CCl₄ | Alcoholic liquid diet + i.p. injections of CCl ₄ 20%; n= 5 |
| EtOH+CCl₄/8wR | Standard rat chow and water during 8 weeks after discontinuation; n = 6 |

Figure 1

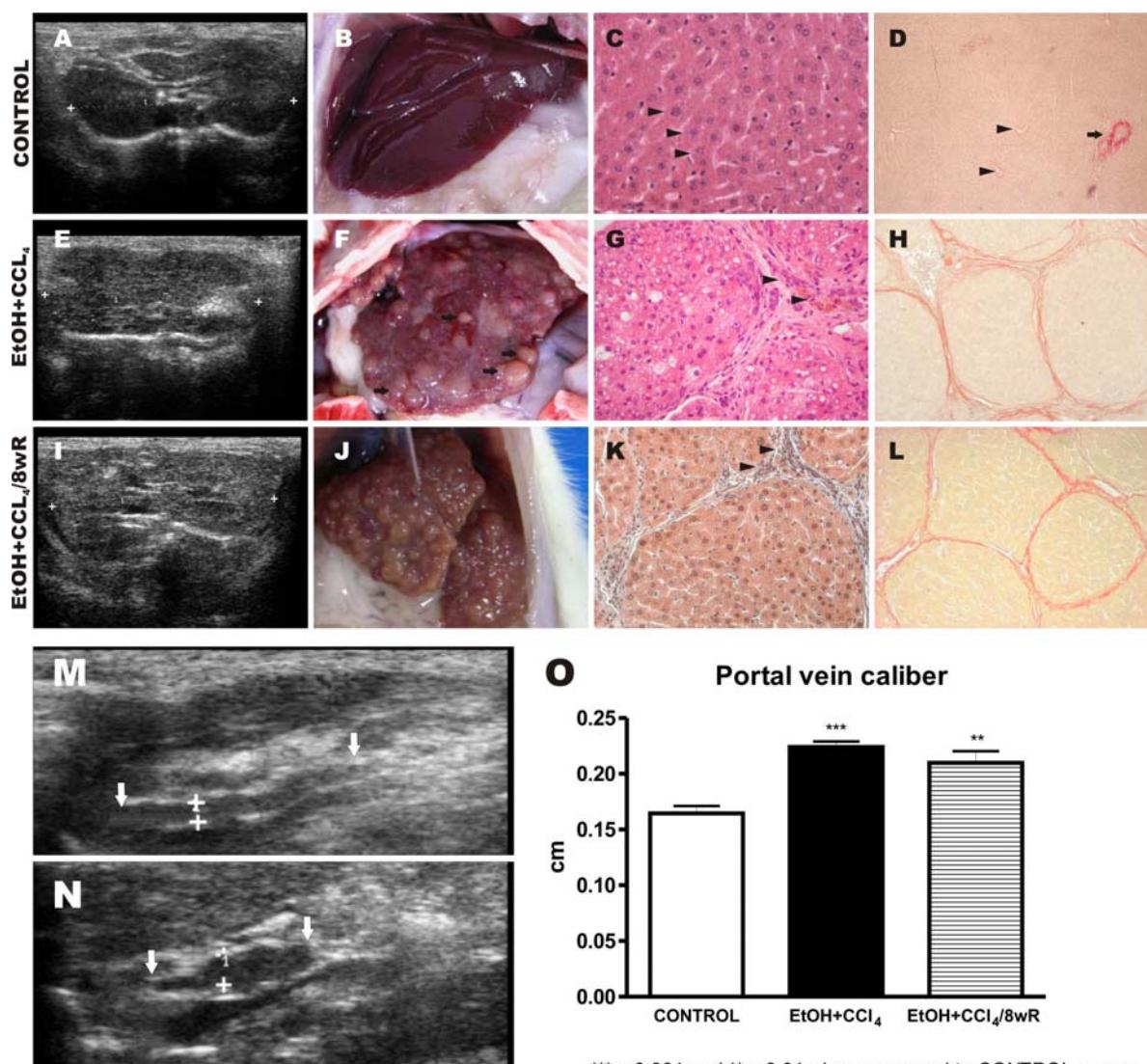
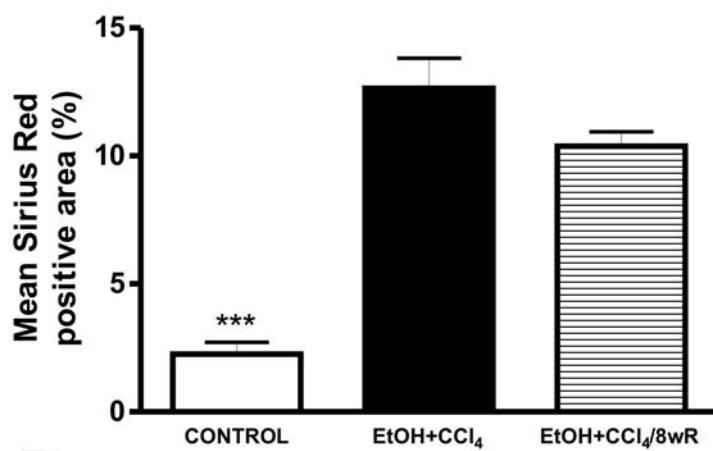


Figure 2

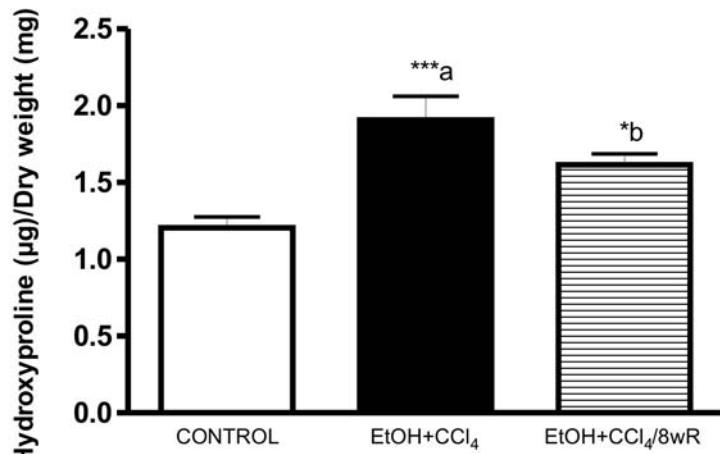
A



B

*** p < 0.001 when compared to both groups

Hydroxyproline (μg)/Dry weight (mg)



***a p<0.001 and *b p<0.05 when compared to CONTROL group

Figure 3

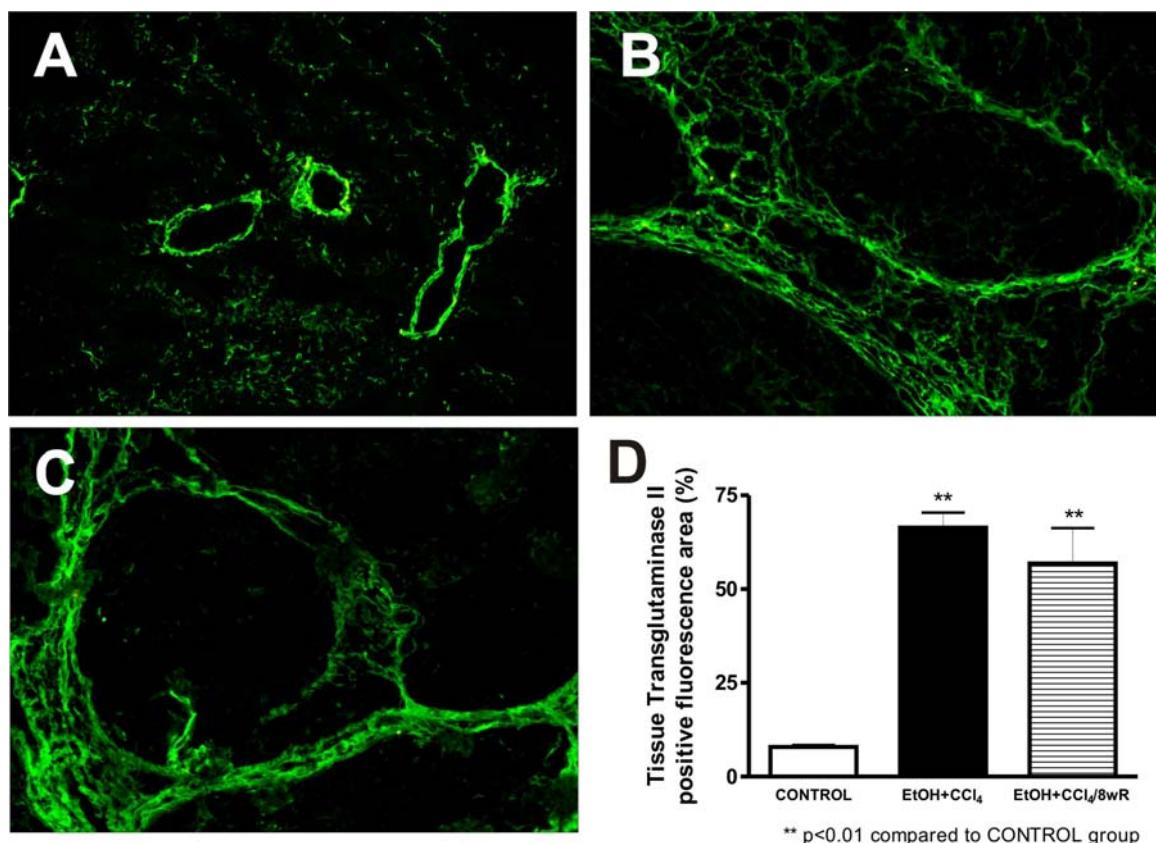
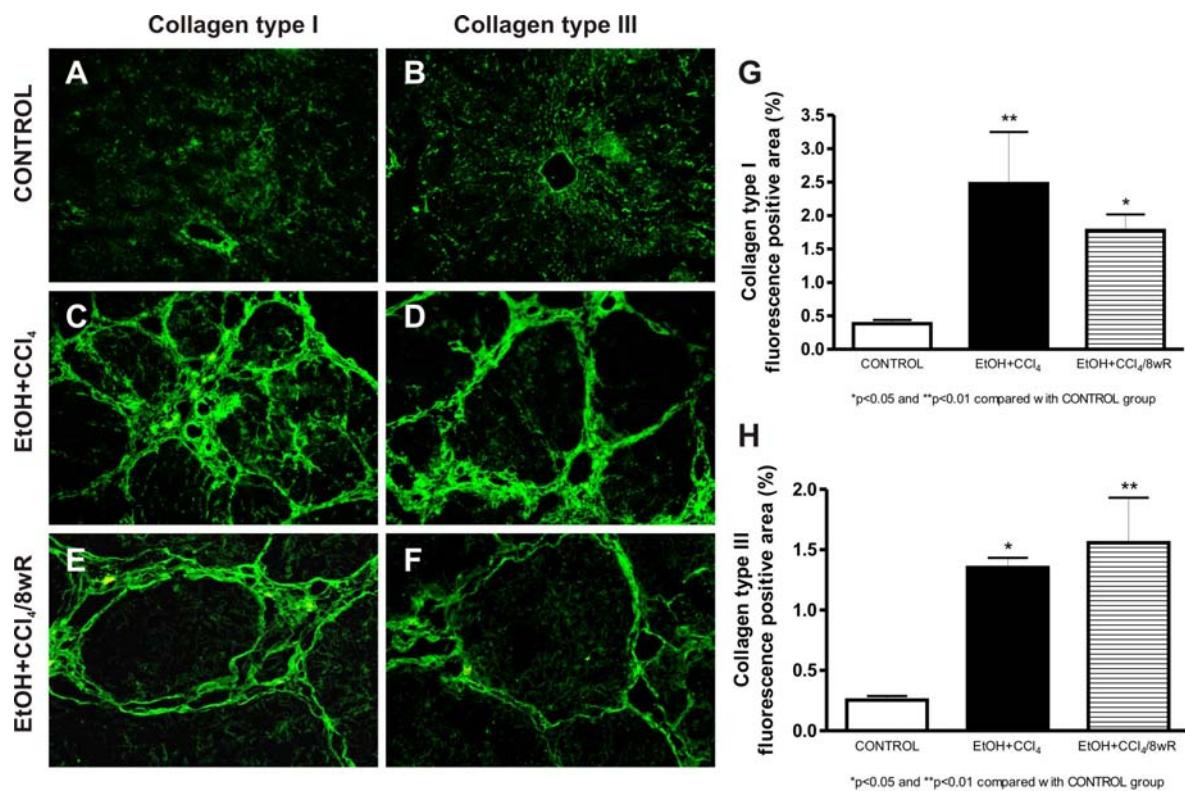


Figure 4



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)