

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

BIANCA GUARALDI COUTO

INFUSÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA
NA CIRROSE HEPÁTICA: ENSAIO CLÍNICO FASE I

RIO DE JANEIRO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BIANCA GUARALDI COUTO

INFUSÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DE MEDULA ÓSSEA
NA CIRROSE HEPÁTICA: ENSAIO CLÍNICO FASE I

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Medicina. Área de concentração em Clínica Médica, setor Gastroenterologia.

Orientadores:

Prof. Henrique Sérgio Moraes Coelho

Prof. Guilherme Ferreira da Motta Rezende

Rio de Janeiro

2009

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está em tudo e em todos.

Aos meus pais, Renato e Marilza, por darem a mim o presente da vida e pelo suporte em todos os sentidos ao longo dos anos.

Ao meu noivo, Júlio Cesar, pelo amor, companheirismo, incentivo constante e terna compreensão nos momentos de ansiedade.

A toda a equipe multiprofissional que contribuiu para a realização deste trabalho com tanto carinho e dedicação.

Aos meus orientadores, Henrique Sérgio e Guilherme Rezende, pela oportunidade da descoberta de uma área tão encantadora do conhecimento. A incansável atenção dispensada a mim permitiu a finalização deste projeto e a conclusão de uma valiosa etapa de minha realização profissional.

RESUMO

Introdução: A cirrose hepática é o resultado comum a diversos tipos de lesão hepática crônica. O único tratamento curativo para a doença e suas complicações é o transplante hepático e apenas uma pequena parcela dos pacientes chega a beneficiar-se dele. A capacidade regenerativa das células-tronco de medula óssea (CTMO) em doenças crônicas tem sido objeto de intensas pesquisas, e os primeiros frutos já surgiram na área da hepatologia. Entretanto, a segurança dos diferentes protocolos propostos na literatura ainda não está estabelecida.

Objetivo: Avaliar exequibilidade e segurança de protocolo original de infusão de CTMO em pacientes com cirrose hepática em lista de transplante. Como objetivos secundários, investigar o padrão de biodistribuição das células infundidas e o comportamento da função hepática após a intervenção.

Métodos: Em um ensaio clínico fase I, foram incluídos pacientes com cirrose hepática e indicação de transplante hepático. Após aspiração por punção da crista ilíaca, a fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO), que contém diversos tipos de células progenitoras, foi separada para infusão. Para garantir que as CMMO chegassem ao destino, a via escolhida foi a artéria hepática. A marcação celular foi realizada com Tecnécio-99m para avaliação da cinética celular precoce por cintigrafia. Ao longo de 12 meses de seguimento, foram avaliados parâmetros clínico-laboratoriais referentes à função hepática e registrada a ocorrência de eventos adversos. No mesmo período, foram realizadas ultrassonografias com *color* Doppler (USD) seriadas para estudar a hemodinâmica dos vasos hepáticos e detectar lesões hepáticas focais. Ao final do seguimento, foi realizada tomografia computadorizada de abdome para rastreamento de carcinoma hepatocelular (CHC).

Resultados: Foram incluídos 8 pacientes, dos quais 7 completaram o acompanhamento. O protocolo foi exequível no contexto de um hospital universitário público. Foram infundidas em média $6,68 \times 10^8$ células ($2 - 15 \times 10^8$) e ao final de 24 horas 26% do radiotraçador permaneceu retido no fígado. Foi observada elevação dos níveis de albumina e queda da bilirrubina total até o terceiro mês e queda discreta dos escores de Child-Pugh e MELD ao primeiro mês. Ao USD, houve aumento transitório do fluxo da artéria hepática em 6 pacientes. O uso da anestesia local com sedação para aspiração da medula óssea não foi exequível. Por outro lado, observamos 1 caso de complicação rara após anestesia geral (síndrome de Tako-tsubo). Em 1 paciente ocorreu dissecação transitória da artéria hepática durante a arteriografia, sem prejuízo de fluxo. Um paciente apresentou diagnóstico de CHC ao 12º. mês e 1 paciente desenvolveu fasciíte eosinofílica, um transtorno imunomediado.

Conclusão: A terapia com CTMO na cirrose hepática é exequível e parece ser segura. Os eventos adversos descritos não configuraram gravidade e não puderam ser atribuídos à infusão celular. O desenvolvimento de CHC não pode ser distinguido de complicação da doença de base. A infusão celular resultou em melhora bioquímica transitória, mas não induziu modificação significativa dos parâmetros clínicos de função hepática.

PALAVRAS-CHAVE: CIRROSE HEPÁTICA, CÉLULA-TRONCO, CÉLULA MONONUCLEAR, MEDULA ÓSSEA, ENSAIO CLÍNICO, TECNÉCIO 99-M.

ABSTRACT

Introduction: Liver cirrhosis is the common endpoint to most types of chronic liver injury. The single curative treatment for the disease and its complications is liver transplantation and only a small fraction of patients benefit from the procedure. The regenerative properties of bone marrow-derived stem cells (BMSC) have been intensively researched, with promising preliminary results in the hepatology field. Nevertheless, the safety of clinical trial protocols in the area has not yet been established.

Objective: To evaluate safety and feasibility of an original protocol involving infusion of BMSC in patients with liver cirrhosis allocated in a transplant waitlist. Secondly, to investigate the biodistribution of the infused cells and to document repercussions in liver function after intervention.

Methods: In a phase I clinical trial design, patients with liver cirrhosis and indication for liver transplantation were included. After iliac crest aspiration, the bone marrow mononuclear cell (BMMC) fraction, which contains a range of progenitor cell types, was separated for infusion. The hepatic artery was the route of choice to ensure cell homing. Intracellular labeling was performed with ^{99m}Techneium and early cell kinetics was evaluated by scintigraphy. Along a 12-month follow up period, clinical and laboratorial parameters regarding liver function as well as any adverse events were registered. In the same period, serial ultrasound with color Doppler (USD) exams were performed to study hemodynamic changes in liver vasculature and to detect focal parenchymal lesions. A computerized tomography scan was performed in the end of follow up for hepatocellular carcinoma (HCC) screening.

Results: Eight patientes were studied and 7 completed follow up. The protocol was considered feasible in the context of a public teaching hospital. Median number of infused cells was $6,68 \times 10^8$ (range $2 - 15 \times 10^8$) and after 24 hours 26% of the radiotracer was retained in the liver. Elevation of serum albumin levels and a decrease in total bilirubin levels were observed until month 3. A slight decrease in Child-Pugh and MELD scores was noted in the first month. Serial USDs revealed a transient increase in hepatic artery flow in 6 patients. The use of local anesthesia with sedation for bone marrow aspiration was not effective. On the other hand, we documented 1 case of a rare complication of general anesthesia in the form of Takotsubo syndrome. During arteriography, 1 patient suffered transitory dissection of the hepatic artery with no hemodynamic consequences. One patient was diagnosed with HCC on the 12^o. month of follow up and 1 patient developed eosinophilic fasciitis, an immunomediated disorder.

Conclusion: Therapy with BMSC in liver cirrhosis is feasible and seems to be safe. The reported adverse events were not a threat to life and could not be directly attributed to the cell infusion. The development of HCC is indistinguishable from a complication of cirrhosis itself. Cell infusion resulted in transient biochemical improvement that did not induce significant changes in clinical parameters of liver function.

KEY WORDS: LIVER CIRRHOSIS, STEM CELL, MONONUCLEAR CELL, BONE MARROW, CLINICAL TRIAL, TECHNETIUM 99-M.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Segmentação hepática segundo Couinaud | 16 |
| Figura 2 | Lóbulo hepático | 17 |
| Figura 3 | Estágios da cirrose hepática | 21 |
| Figura 4 | Média dos valores de hemoglobina | 80 |
| Figura 5 | Média das contagens de plaquetas | 81 |
| Figura 6 | Média dos valores de AST | 81 |
| Figura 7 | Média dos valores de ALT | 81 |
| Figura 8 | Valores de albumina sérica por paciente | 82 |
| Figura 9 | Média dos valores de albumina | 82 |
| Figura 10 | Valores de bilirrubina total por paciente | 83 |
| Figura 11 | Média dos valores de bilirrubina total | 83 |
| Figura 12 | Valores de INR por paciente | 84 |
| Figura 13 | Média dos valores de INR | 84 |
| Figura 14 | Escore de Child-Pugh por paciente | 85 |
| Figura 15 | Média do escore de Child-Pugh | 85 |
| Figura 16 | Escore MELD por paciente | 86 |
| Figura 17 | Média do escore MELD | 86 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Classificação da função hepática conforme Child-Pugh | 28 |
| Quadro 2 | Protocolo de seguimento | 66 |
| Tabela 1 | Ensaio clínico: CTMO autólogas na cirrose hepática | 44 |
| Tabela 2 | Características da amostra | 70 |
| Tabela 3 | Celularidade do material infundido | 71 |

LISTA DE ANEXOS

| | | |
|---------|--|-----|
| Anexo 1 | Termo de consentimento livre e esclarecido | 108 |
| Anexo 2 | Trabalho apresentado em congresso mundial | 110 |
| Anexo 3 | Artigo submetido a publicação | 111 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-AAF - 2-acetilaminofluoreno
99mTc - Tecnécio-99m
AFP – alfa-fetoproteína
AST – aspartato aminotransferase
ALT – alanina aminotransferase
BMSC – do inglês: *bone marrow-derived stem cells*
BT – bilirrubina total
CCl₄ – tetracloreto de carbono
CHC – carcinoma hepatocelular
CMMO – células mononucleares derivadas de medula óssea
CONEP – Comissão Nacional para a Ética em Pesquisa
CP – classificação de Child-Pugh
Cr – creatinina sérica
CT – célula-tronco
CTMO – células-tronco derivadas da medula óssea
CXCR4 - receptor 4 de citocina do grupo CXC
DHGNA - doença hepática gordurosa não-alcoólica
DM2 – diabetes mellitus tipo 2
EH - encefalopatia hepática
EPC – células progenitoras endoteliais
FA – fosfatase alcalina
FAH(-/-) – fumaril acetoacetato hidrolase *knockout*
G-CSF – do inglês: *granulocyte colony stimulating factor*
GGT – gama-glutamil transferase
GVHD – doença enxerto versus hospedeiro
HAS – hipertensão arterial sistêmica
HCC – do inglês: *hepatocellular carcinoma*
HDA – hemorragia digestiva alta
HGF – fator de crescimento de hepatócitos
HPC – célula progenitora hepática
HSC – célula-tronco hematopoiética

HSCT – transplante de células-tronco hematopoiéticas
HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
LSN – limite superior da normalidade
MAPC – células progenitoras multipotentes adultas
MEC – matriz extracelular
MELD – do inglês: *model for end stage liver disease*
MMP – metaloproteinases da matriz
MO – medula óssea
MSC - células multipotentes mesenquimais estromais
PBE - peritonite bacteriana espontânea
PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular
PIIIP – peptídeo pró-colágeno III
RM – ressonância magnética
SCF – do inglês: *stem cell factor*
SnCl₂ - cloreto estanoso
SDF-1 – fator derivado de célula estromal tipo 1
SHR – síndrome hepatorenal
TAP – tempo de protrombina
TC – tomografia computadorizada
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido
TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinases
TIPS - derivação portossistêmica intra-hepática transjugular
UNOS - Rede Unificada de Compartilhamento de Órgãos
US – ultrassonografia bidimensional
USD – ultrassonografia com *color* Doppler
VEGF – fator de crescimento vascular e endotelial
VEGFR-1 – receptor do VEGF
VHB – vírus da hepatite B
VHC – vírus da hepatite C
VLA-4 – do inglês: *very late antigen type 4*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 15 |
| 3.1 O FÍGADO | 15 |
| 3.1.1 Anatomia e fisiologia | 15 |
| 3.1.2 Fibrogênese e regeneração | 17 |
| 3.1.3 Reversibilidade da fibrose | 18 |
| 3.2 CIRROSE HEPÁTICA | 19 |
| 3.2.1 Definição e epidemiologia | 19 |
| 3.2.2 História natural e prognóstico | 20 |
| 3.3 INDICADORES DE LESÃO E DISFUNÇÃO HEPÁTICA | 24 |
| 3.3.1 Indicadores laboratoriais | 25 |
| 3.3.2 Escores de gravidade e prognóstico | 27 |
| 3.4 AVALIAÇÃO HEPÁTICA POR IMAGEM | 29 |
| 3.4.1 Ultrassonografia abdominal | 29 |
| 3.4.2 Tomografia computadorizada e ressonância magnética | 29 |
| 3.5 TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA TERMINAL | 30 |
| 3.5.1 Transplante hepático | 30 |
| 3.5.2 Outras terapias | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO..... | 31 |
| 3.6.1 Definições | 32 |
| 3.6.2 Células-tronco derivadas da medula óssea | 33 |
| 3.6.3 Mecanismos de regeneração tecidual..... | 35 |
| 3.6.4 Aplicação clínica | 36 |
| 3.6.5 Avaliação da cinética celular..... | 37 |
| 3.7 CÉLULAS-TRONCO EM HEPATOLOGIA | 38 |
| 3.7.1 Células-tronco hepáticas..... | 38 |
| 3.7.2 Mecanismos de interação | 39 |
| 3.7.3 Controvérsias..... | 39 |
| 3.7.4 Tipos celulares e aplicabilidade | 41 |
| 3.7.5 Estudos clínicos | 42 |
| 3.7.6 Avaliando segurança em ensaios clínicos | 55 |
| 4 PACIENTES E MÉTODOS | 58 |
| 4.1 DESENHO DO ESTUDO | 58 |
| 4.2 CASUÍSTICA E CAPTAÇÃO DA AMOSTRA | 58 |
| 4.3 ASPECTOS ÉTICOS..... | 60 |
| 4.4 AVALIAÇÃO PRÉ INCLUSÃO | 61 |
| 4.5 PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO..... | 62 |
| 4.6 PROTOCOLO DE SEGUIMENTO | 65 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 67 |
| 4.8 ANÁLISE DE EXEQUIBILIDADE E SEGURANÇA | 67 |
| 5 RESULTADOS..... | 69 |

| | |
|---|------------|
| 5.1 REESTRUTURAÇÃO DO DESENHO..... | 69 |
| 5.2 ANÁLISE DESCRITIVA..... | 69 |
| 5.2.1 Características gerais da amostra | 69 |
| 5.2.2 Celularidade do material infundido..... | 70 |
| 5.2.3 Cinética celular | 71 |
| 5.2.4 Evolução individual | 72 |
| 5.2.5 Parâmetros laboratoriais | 80 |
| 5.2.6 Escore de Child-Pugh | 85 |
| 5.2.7 Escore MELD..... | 86 |
| 5.2.8 Parâmetros ultrassonográficos | 87 |
| 5.2.9 Exequibilidade e segurança | 88 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO | 90 |
| | |
| 7 CONCLUSÃO | 97 |
| | |
| 8 RECOMENDAÇÕES..... | 98 |
| | |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 99 |
| | |
| 10 ANEXOS | 108 |

1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão indispensável para a homeostase e tornou-se célebre através dos tempos por sua extraordinária capacidade de regeneração. Os próprios hepatócitos maduros são as células responsáveis por reentrar o ciclo celular e repor as perdas de seus pares em situações de lesão ou senescência. Quando existe uma agressão persistente ao tecido hepático, a resposta inflamatória prolongada pode levar a acúmulo e descaracterização da matriz extracelular, culminando na fibrose hepática. [1, 2] A progressão para a cirrose é muitas vezes inevitável. Felizmente, o rápido avanço das pesquisas no campo da reversibilidade da fibrose hepática sugere que mesmo na cirrose, quando a regeneração hepática está prejudicada e a arquitetura tecidual distorcida, uma reversão significativa possa ser atingida. [3]

A cirrose hepática é resultado comum a diversos tipos de lesão hepática crônica e está associada a marcante morbi-mortalidade. O paciente com cirrose está sujeito a complicações decorrentes da insuficiência hepatocelular, da hipertensão portal, do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma e de disfunções de outros sistemas. O único tratamento comprovadamente eficaz da cirrose é a substituição do órgão através do transplante, em uma das cirurgias de maior porte na Medicina. Além de não haver doadores para todos, o risco operatório e os efeitos colaterais a longo prazo dos imunossupressores tornam o procedimento ainda mais restritivo. Novas estratégias, como o transplante de hepatócitos e o suporte hepático bioartificial, são resultado dos constantes esforços para reduzir a mortalidade em lista de transplante. No entanto, ainda são considerados métodos experimentais. [4]

A capacidade regenerativa de células progenitoras da medula óssea já é usada há quase meio século para o tratamento de doenças hematológicas. Na

última década, relatos de células da medula óssea humana 'transformando-se' em hepatócitos *in vivo* chamaram atenção para novas propriedades regenerativas dessa população celular. Em paralelo à pesquisa com células-tronco embrionárias, numerosos grupos já haviam documentado a geração de células não-hematopoiéticas como neurônios, miócitos, endotélio e hepatócitos a partir de células da medula óssea. A descoberta desta plasticidade em células-tronco adultas foi uma quebra de paradigma e encorajou estudos experimentais visando à regeneração tecidual. Ensaio clínico em cardiologia e doenças auto-imunes encontram-se particularmente avançados. [5]

Em hepatologia, a euforia foi acentuada pela 'cura' induzida por células-tronco da medula óssea em um modelo experimental de tirosinemia. As pesquisas em animais avançaram e hoje sabemos que a quantidade de células que sofrem transdiferenciação em hepatócitos *in vivo* é muito pequena. Outros mecanismos contribuem para os efeitos das células-tronco no tecido, como a fusão com células locais, a liberação de citocinas com efeito proliferativo e anti-fibrótico e a imunomodulação. Existem na medula óssea células-tronco de tipos diferentes, e assim, também, parecem ser seus efeitos no tecido. Ensaio clínico preliminares em hepatologia têm indicado a segurança desta modalidade de terapia celular e demonstrado alguns efeitos benéficos. [6]

Baseados nisso, desenhamos um estudo clínico fase I para avaliação de segurança e exequibilidade da infusão de células mononucleares autólogas da medula óssea em pacientes com cirrose hepática. Optamos por também estudar a cinética destas células através de marcação com radioisótopo, abordagem ainda não realizada no campo da hepatologia. A evolução clínica foi avaliada por diferentes parâmetros durante o seguimento, que foram registrados e descritos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da terapia com células-tronco autólogas de medula óssea em pacientes com cirrose hepática e indicação de transplante hepático.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a exequibilidade e a segurança de protocolo de infusão de células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea em pacientes com cirrose hepática;
- ✓ Descrever a cinética das células mononucleares autólogas derivadas da medula óssea marcadas com radiotraçador após infusão na artéria hepática;
- ✓ Avaliar a modificação dos parâmetros clínicos e medir a variação dos parâmetros bioquímicos referentes à função hepática ao longo do seguimento;
- ✓ Descrever os eventos adversos observados durante o seguimento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O FÍGADO

3.1.1 Anatomia e fisiologia

O fígado é um órgão crucial para a manutenção da homeostase. É responsável pela síntese, armazenamento e metabolismo de nutrientes, além da produção de proteínas séricas, fatores de coagulação, lipoproteínas, enzimas e hormônios. Constitui o principal órgão de detoxificação do corpo, removendo escórias e drogas através de conversão metabólica e excreção biliar. Atuando na regulação dos níveis séricos de glicose e amônia, viabiliza o funcionamento do sistema nervoso central. Além disso, durante a vida intra-uterina, exerce intensa atividade hematopoiética. [1]

O órgão, no adulto, representa 1/50 do peso corporal total. Pode ser dividido funcionalmente em lobos (direito e esquerdo) e segmentos (I a VIII). [7]

O suprimento sanguíneo do fígado é duplo, sendo 70% do fluxo proveniente do sistema porta e 30% da artéria hepática. A veia porta é formada pela confluência das veias mesentérica superior e esplênica, trazendo sangue venoso dos intestinos, pâncreas e baço e constituindo um sistema fechado. A artéria hepática origina-se do tronco celíaco e supre o fígado com sangue arterial. Não existem, em condições normais, fístulas arterio-venosas entre estes dois territórios vasculares. A drenagem venosa do fígado é feita por três veias hepáticas principais, que desembocam na veia cava inferior. [8] (Figura 1)

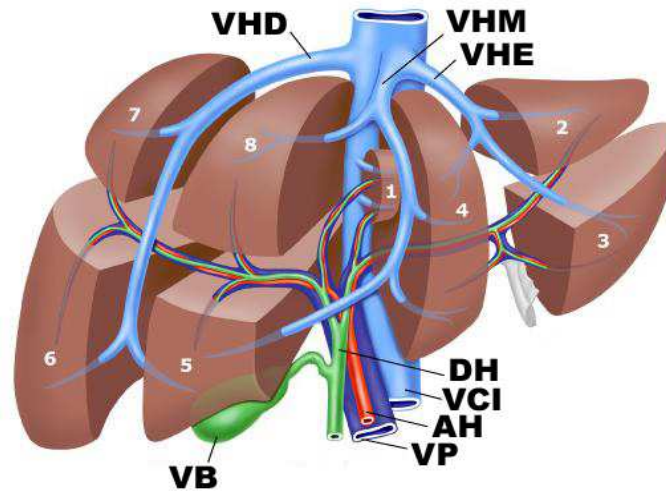


Figura 1. Segmentação hepática segundo Couinaud. VCI: veia cava inferior; VP: veia porta; AH: artéria hepática; DH: ducto hepático; VB: vesícula biliar; VHD: veia hepática direita; VHM: veia hepática média; VHE: veia hepática esquerda. Segmentos indicados em algarismos arábicos. Adaptado de Medscape.com.

Microscopicamente, o fígado é dividido em lóbulos hexagonais de 1 a 2 mm de diâmetro, orientados ao redor de tributárias terminais da veia hepática que recebem a denominação de veias centrais. Em cada vértice deste hexágono observamos uma tríade portal, formada por um ramo terminal da artéria hepática e da veia porta e por um ducto biliar interlobular. [9]

No interior dos lóbulos os hepatócitos, que constituem cerca de 80% da massa hepática, estão orientados como cordões radialmente dispostos em relação à veia central. Entre os cordões de hepatócitos encontram-se os sinusóides vasculares, que são formados por células endoteliais descontínuas e fenestradas, demarcando um espaço extra-sinusoidal conhecido como espaço de Disse. Os canalículos biliares originam-se dos canais de Hering, uma zona transicional entre os hepatócitos e os primeiros colangiócitos, onde a bile começa a ser formada. [8, 9]

As células de Kupffer situam-se junto à face luminal das células endoteliais. São macrófagos locais ativados em situação de lesão hepática e produzem uma

ampla gama de citocinas. Sua população pode ser reforçada por imigração de sítios extra-hepáticos. As células estreladas, também conhecidas como células de Ito, encontram-se no espaço de Disse e são responsáveis pelo armazenamento de lipídios e vitamina A. Em situação de lesão hepática também sofrem ativação, podendo tornar-se miofibroblastos produtores de matriz extracelular (MEC). Estas células exercem um papel marcante na progressão da fibrose que leva à doença hepática crônica. [1] (Figura 2)

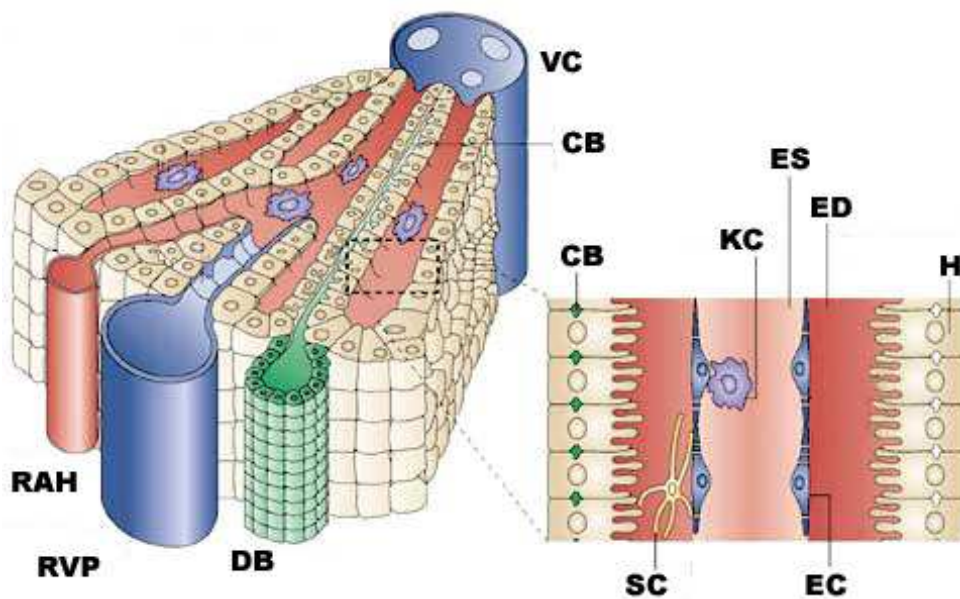


Figura 2. Lóbulos hepático. VC: veia central; DB: ducto biliar; RVP: ramo da veia porta; RAH: ramo da artéria hepática; CB: canalículo biliar; SC: célula estrelada; KC: célula de Kupffer; ES: espaço sinusoidal; ED: espaço de Disse; EC: célula epitelial; H: hepatócito.

3.1.2 Fibrogênese e regeneração

A surpreendente capacidade regenerativa do fígado é conhecida desde a idade antiga, representada pelo mito de Prometeu. [10] O processo de regeneração hepática é extremamente complexo, podendo ser desencadeado por lesão aguda, crônica ou por hepatectomia parcial. Em humanos, após a ressecção de 75% do

fígado, os hepatócitos restantes rapidamente reentram o ciclo celular. Em 1 semana, o órgão retorna ao número original de células e em 2 a 3 semanas recupera a massa tecidual original. Diversos fatores de crescimento, citocinas e hormônios estão envolvidos na regulação da regeneração hepática. [1, 11, 12]

A restauração da intrincada arquitetura do fígado após uma lesão pode ser completa após a retirada do agente agressor. No entanto, em casos de agressão repetida ou crônica, há risco de formação de tecido cicatricial (fibrose) com alterações marcantes da quantidade e qualidade da MEC. Há ativação das células estreladas e aumento da produção principalmente de colágenos I e IV, mais proteínas não-colágenas da MEC. Esta 'neomatriz' é depositada no espaço de Disse e prejudica a interação do parênquima hepático com a microvasculatura. Com a progressão da fibrose, há distorção da arquitetura hepática e formação dos nódulos característicos da cirrose. [3]

3.1.3 Reversibilidade da fibrose

Quando o tratamento direcionado para a causa da fibrose hepática está disponível e é instituído, pode ocorrer remodelamento do tecido fibrótico ao ponto da recuperação histológica completa. Mesmo na cirrose hepática pode ser observada recuperação da função hepatocelular e melhora da hipertensão portal, como na hepatite auto-imune pós-imunossupressão ou nas hepatites crônicas pelo vírus B (VHB) ou C (VHC) tratadas. [3] Na hepatopatia alcoólica, a abstinência de álcool melhora o padrão histológico hepático, reduz a hipertensão portal e aumenta a sobrevida. No entanto, a confirmação da abstinência alcoólica é dificultada, na prática, pela ausência de testes específicos e de fácil execução. [9]

Existe um interesse crescente no estudo da reversibilidade da fibrose hepática. São agentes cruciais neste processo as metaloproteinases da matriz (MMP), uma família de endoproteinases capazes de degradar a neomatriz. Essas enzimas são liberadas principalmente pelas células estreladas e pelas células de Kupffer, e antagonizadas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e outras substâncias, também produzidos pelas células estreladas. O predomínio do estado de inativação ou apoptose nestas células parece ser condição fundamental para desencadear a reversão da fibrose hepática em modelos com ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl₄) [13, 14] e submetidos a ligadura do ducto biliar. [15]

As evidências acumuladas em favor da reversibilidade da fibrose colocam a doença hepática crônica, mesmo em estágio de cirrose, como uma condição dinâmica e potencialmente passível de reversão. [3, 11]

3.2 CIRROSE HEPÁTICA

3.2.1 Definição e epidemiologia

A cirrose hepática é um estágio avançado de evolução de fibrose, em que o tecido cicatricial preenche o espaço de Disse, reduz a fenestração dos sinusóides e distorce a arquitetura tecidual, com formação de nódulos circundados por faixas de tecido fibroso. Isto culmina em perda de função dos hepatócitos e aumento da resistência vascular no fígado (hipertensão portal). O fígado cirrótico caracteriza-se também pela redução de sua capacidade de regeneração. [8]

Embora a cirrose hepática possa ser causada por agressões metabólicas, auto-imunes, pós-necróticas, virais e tóxicas, todas resultam no mesmo produto final e envolvem via patogênica comum. Hepatite crônica por VHC e o abuso de álcool são as principais causas de cirrose hepática na maioria dos países, sendo que a hepatite por VHB prevalece em parte da Ásia e da África subsaariana. A hepatite pela DHGNA, ou esteato-hepatite, foi recentemente apontada como responsável pela 'cirrose criptogênica' de muitos diabéticos obesos. [4]

A prevalência real da cirrose no mundo é desconhecida. Já foi estimada em 0,15% ou 400.000 pessoas nos EUA, o que correspondeu em 1998 a 25.000 óbitos. [16] Estes números estão provavelmente subestimados, já que a cirrose pelo vírus da hepatite C (VHC) e pela doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA) frequentemente não são diagnosticados e a cirrose compensada pode permanecer silenciosa por longos anos. Schuppan *et al.* consideraram que a prevalência da cirrose histológica poderia chegar a 1% da população geral. [4]

3.2.2 História natural e prognóstico

Sabemos hoje que a cirrose hepática apresenta múltiplos estágios de gravidade, de acordo com o grau de acúmulo de MEC, o nível de hipertensão portal e o grau de disfunção hepatocitária. Pode cursar com um período longo de cirrose compensada, ou seja, livre de complicações e geralmente assintomática, que pode durar mais de dez anos. No entanto, após a primeira complicação, aumenta o risco para novos eventos e a mortalidade sem o transplante pode chegar a 85% em 5 anos. [4] O termo cirrose descompensada é usado na presença de ascite, hemorragia digestiva alta (HDA) varicosa, encefalopatia hepática e/ou icterícia. A

evolução natural da cirrose hepática pode ser dividida em estágios, segundo o consenso de Baveno IV: [17] (Figura 3)

Estágio 1: ausência de ascite ou varizes de esôfago. Mortalidade de 1% ao ano. A taxa de progressão é de 11,4% ao ano, cumulativa.

Estágio 2: presença de varizes de esôfago, sem ascite ou HDA prévia. Mortalidade de 3,4% ao ano.

Estágio 3: surgimento de ascite, sem HDA prévia. A mortalidade sobe para 20% ao ano. O risco de HDA neste estágio é de 7,6% ao ano.

Estágio 4: pacientes que já apresentaram HDA. A taxa de mortalidade chega a 57% ao ano, e metade dos óbitos ocorrem nas 6 primeiras semanas após o primeiro episódio de sangramento.

| | | | | |
|-----------------|--------------|--------------|-------------------|--------------------------|
| Fibrose: | [Progressão] | | [Progressão] | |
| HVPG: | 5 | ≥10 | ≥12 | ≥20 |
| Clínica: | Nada | Varizes | Ascite, HDA, EH | Pior prognóstico pós HDA |
| Estágio: | Compensado 1 | Compensado 2 | Descompensado 3/4 | |

Figura 3. Estágios da cirrose hepática. HVPG: gradiente de pressão venosa hepática; HDA: hemorragia digestiva alta; EH: encefalopatia hepática. Adaptado de Friedman *et al.* [11]

Os estágios 1 e 2 correspondem à cirrose compensada, ou seja, sem sinais clínicos de hipertensão portal (varizes) ou ascite. A incidência de carcinoma

hepatocelular segue um ritmo constante ao longo da evolução da cirrose e seu prognóstico está relacionado ao estágio da doença em que o paciente se encontra. [18]

O recente avanço na prevenção e tratamento das complicações específicas da cirrose hepática ocasionou importante redução de morbi-mortalidade. No entanto, pacientes com insuficiência hepática crônica estão suscetíveis a respostas sistêmicas alteradas em diversas situações. Apresentam disfunção imunológica e estão sob maior risco de infecções em geral, além de apresentarem tendência ao catabolismo e à desnutrição. Em situações de agressão como o sangramento, a sepse ou mesmo uma cirurgia podem manifestar respostas inflamatórias inadequadas para o insulto, evoluindo com pior prognóstico. [19]

A HDA por varizes gástricas e esofagianas é causada pelo aumento da pressão no sistema porta. É a mais letal das complicações da doença hepática crônica e pode desencadear outras complicações, como ascite, peritonite bacteriana espontânea e síndrome hepatorenal. Seu controle é comumente dificultado pela presença de plaquetopenia e deficiência de fatores da coagulação. [9] A probabilidade de sangramento está relacionada ao tamanho das varizes, à presença de 'sinais vermelhos' ao exame endoscópico e à gravidade da insuficiência hepática. [20]

A ascite é o acúmulo de líquido no espaço intraperitoneal e constitui a forma mais comum de descompensação da cirrose hepática. Resulta do aumento da pressão no sistema porta e, na cirrose, esse processo é potencializado por outros fatores como hipoalbuminemia, retenção de sal e água (hiperaldosteronismo secundário) e vasodilatação esplâncnica. [9]

O líquido ascítico, pobre em opsoninas, pode sofrer colonização e infecção culminando na peritonite bacteriana espontânea (PBE). A mortalidade secundária a PBE caiu nos últimos 25 anos, mas este evento é considerado fator de mau prognóstico com possível evolução para síndrome hepatorenal e morte por falência orgânica múltipla. [9]

A cirrose hepática pode cursar com anormalidades funcionais renais de espectro variável. São secundárias a vasoconstrição da circulação renal e potencialmente reversíveis. A manifestação mais grave consiste na síndrome hepatorenal (SHR). Sua manifestação aguda leva a mortalidade de 100% caso não haja resposta ao tratamento farmacológico ou caso o paciente não seja submetido ao transplante hepático. [9]

A encefalopatia hepática (EH) é uma síndrome neuropsiquiátrica que leva a alteração do comportamento e do nível de consciência, reduzindo a qualidade de vida e podendo levar ao coma. Possui fisiopatologia complexa e ocorre principalmente em pacientes com disfunção hepatocelular. A hipertensão portal acentuada, por estar associada à redução relativa do fluxo sanguíneo para o fígado, também pode contribuir para o surgimento dos sintomas. [9]

A cirrose hepática de qualquer etiologia é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC). No mundo, 80% dos casos de CHC estão relacionados à infecção pelos VHB ou VHC. A incidência tende a aumentar em países desenvolvidos devido à ascensão das hepatopatias relacionadas à obesidade e diabetes *mellitus*. O risco de desenvolvimento de CHC em pacientes com cirrose pode superar 6% ao ano, e embora o rastreio semestral com ultrassonografia e dosagem de α -fetoproteína (AFP) permaneça controverso, pode auxiliar na detecção de pequenos tumores com melhor prognóstico.

Tratamentos considerados curativos são a ressecção, viável na minoria dos pacientes, e a ablação por radiofrequência. A alcoolização e a quimioembolização são realizadas com intuito paliativo e como ponte para o único tratamento curativo que elimina o tumor e o fator de risco (o próprio fígado cirrótico), o transplante hepático. [21]

A cirrose hepática é fator de risco estabelecido para trombose de veia porta, que por sua vez pode desencadear ascite, HDA e piora da função hepática. [22] As síndromes portopulmonar e hepatopulmonar causam cansaço aos esforços e queda da qualidade de vida. A cardiomiopatia cirrótica cursa com hipertrofia ventricular e resposta cardíaca inadequada ao estresse. Estes transtornos cardiocirculatórios podem tornar-se graves a ponto de contraindicar o transplante hepático. [4]

O fígado é, ainda, componente fundamental para o equilíbrio endócrino. A cirrose hepática está associada com aumento da incidência de intolerância à glicose, resistência insulínica e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Hipogonadismo, osteoporose, disfunção tireoidiana e insuficiência adrenal relativa também estão relacionados com a presença de doença hepática crônica. [9]

3.3 INDICADORES DE LESÃO E DISFUNÇÃO HEPÁTICA

Os exames bioquímicos são necessários para direcionar a propedêutica, estimar a gravidade, avaliar o prognóstico e estabelecer a terapêutica na doença hepática. O termo “prova de função hepática” é erroneamente utilizado na prática clínica, já que as dosagens séricas mais utilizadas para avaliação do fígado (aminotransferases e fosfatase alcalina) refletem, principalmente, dano aos hepatócitos, sem que haja necessariamente prejuízo de suas funções. As

verdadeiras provas de função hepática avaliam, entre outros parâmetros, a capacidade de síntese de proteínas (albumina e fatores de coagulação) e o metabolismo e excreção da bilirrubina. [8]

3.3.1 Indicadores laboratoriais

Aminotransferases

Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são os indicadores mais relacionados à necrose hepatocelular. Estas enzimas foram denominadas anteriormente transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO), respectivamente. A ALT e a AST são liberadas na circulação quando os hepatócitos ou suas membranas celulares são danificados. Entretanto, a correlação entre a extensão da necrose hepática e os níveis séricos de aminotransferases é fraca e valores normais de aminotransferases séricas não afastam a presença de lesão hepatocelular. [9]

Fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (GGT)

FA e GGT são marcadores tipicamente utilizados para identificar colestase. Níveis elevados de FA são encontrados normalmente nas células de rápida divisão celular ou em tecidos metabolicamente ativos. Em pacientes com doenças hepatobiliares, o aumento nos níveis de FA resulta do aumento da produção hepática com extravasamento para o sangue. [9]

A GGT está presente nas membranas celulares de múltiplos tecidos. É um marcador sensível, porém menos específico, de doença hepatobiliar. Apresenta melhor correlação com lesão biliar que hepatocelular, embora possa elevar-se na

esteatose hepática e na infecção pelo VHC. Pode, ainda, estar elevada por ingestão de álcool ou uso de certos medicamentos. [8]

Bilirrubina total (BT) e frações

A bilirrubina é derivada principalmente do catabolismo das hemácias, sendo transportada ao fígado, conjugada ao ácido glucurônico e excretada na bile. Os termos frações direta e indireta baseiam-se na reação original de van den Bergh, um método de mensuração da bilirrubina não conjugada. Em pacientes com lesão hepatocelular aguda ou na cirrose avançada, pode ocorrer aumento dos níveis de BT às custas da fração conjugada, por extravasamento para o sangue. Em pacientes com hipertensão portal acentuada e hiperesplenismo, a fração não-conjugada pode estar elevada pela existência de hemólise intravascular. [8]

Albumina

A albumina é sintetizada exclusivamente no fígado e sua concentração sérica depende da taxa de síntese, do volume total de distribuição e da existência de perdas. Como reflete a capacidade de síntese hepática, a hipoalbuminemia é um bom marcador de gravidade na cirrose hepática e pode ser acentuada por ingestão de álcool, perda urinária, estados inflamatórios crônicos e desnutrição. [9]

Tempo de protrombina (TAP)

A gravidade e o prognóstico da doença hepática podem ser avaliados através do TAP, que reflete a deficiência de um ou mais fatores de coagulação sintetizados pelo fígado. O TAP encontra-se prolongado na insuficiência hepática avançada, e será corrigido após administração parenteral de vitamina K somente em caso de

colestase ou deficiência da vitamina. O uso da razão normalizada internacional (INR) é uma forma de padronizar os valores de TAP, evitando variações entre laboratórios. [9]

3.3.2 Escores de gravidade e prognóstico

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos escores para classificação da gravidade da doença hepática e definição de prognóstico, sendo utilizados indicadores laboratoriais associados ou não a parâmetros clínicos. Devido à ampla variabilidade na evolução clínica de pacientes com cirrose, o estabelecimento de um prognóstico é sempre um desafio. Além de estimar sobrevida, o escore ideal deve prever a capacidade de um paciente suportar um dado procedimento e definir se uma opção terapêutica ofereceria chance de sobrevida. Somam-se a estas dificuldades a necessidade de estabelecer o momento ótimo da indicação de transplante e o critério utilizado para alocação de órgãos. [23]

Classificação de Child-Pugh

A classificação de Child-Pugh (CP) é um escore proposto há mais de 30 anos como preditor prognóstico pós correção cirúrgica de hipertensão portal em pacientes com cirrose. [24] Modificado através do tempo, hoje inclui 3 variáveis laboratoriais (albumina, BT e TAP) e 2 variáveis clínicas subjetivas (ascite e EH), e é amplamente utilizado até os nossos dias. No entanto, possui limitações, como a quantificação subjetiva dos graus de ascite e encefalopatia e por não considerar a presença de CHC. Além disso, todas as cinco variáveis deste escore recebem o mesmo peso. De

acordo com a pontuação, os pacientes podem ser classificados como CP A (5 a 6 pontos), CP B (7 a 9 pontos) e CP C (10 a 15 pontos). [23] (Quadro 1)

Quadro 1. Classificação da função hepática conforme Child-Pugh. [23]

| Variáveis | 1 ponto | 2 pontos | 3 pontos |
|-------------------------------|---------|------------|-------------|
| Encefalopatia hepática | Ausente | Grau I/II | Grau III/IV |
| Ascite | Ausente | Controlada | Refratária |
| Albumina (g/dL) | >3,5 | 2,8-3,5 | <2,8 |
| BT (mg/dL) | <2,0 | 2,0-3,0 | >3,0 |
| TAP (s) * | <4,0 | 4,0-6,0 | >6,0 |

* Diferença entre o paciente e o controle em segundos. BT, bilirrubina total; TAP, tempo de protrombina. Graus de encefalopatia hepática: I - euforia ou depressão, leve confusão, raciocínio alentecido, distúrbio do sono; II - letargia, confusão moderada; III - marcante confusão, discurso incoerente, sonolento e despertável; IV - coma.

Escore MELD (*Model for end-stage liver disease*)

O escore MELD foi desenvolvido originalmente para avaliação de prognóstico em pacientes com cirrose candidatos a criação de TIPS (derivação portossistêmica intra-hepática transjugular). [25] Trata-se de um modelo matemático complexo que utiliza BT, INR e creatinina sérica (Cr), calculado segundo a seguinte fórmula:

$$MELD = 9.6 \times \log_e (Cr) + 3.8 \times \log_e (BT) + 11.2 \times \log_e (INR) + 6.4$$

Os valores de creatinina (mg/dL), BT (mg/dL) e INR que estejam abaixo de 1 são arredondados para 1. Valores de Cr acima de 4 mg/dL são arredondados para 4 e todos os pacientes em hemodiálise também recebem valor igual a 4. O escore MELD varia entre 6 e 40 pontos e foi testado para avaliação de mortalidade precoce (3 meses) após entrada do paciente na lista de transplante e é utilizado para alocação de órgãos nos Estados Unidos [26] e, desde 2006, no Brasil. [27] O escore

MELD ganha em acurácia ao excluir a avaliação de variáveis subjetivas, porém desfavorece pacientes com ascite ou EH graves que ainda mantêm função hepática laboratorial razoável. [23] Pacientes com CHC e doenças hepáticas específicas recebem pontuação especial, o que possibilita a antecipação do transplante. Atualmente, no HUCFF, são referidos para o Ambulatório de Transplante Hepático os pacientes que possuam escore MELD acima de 20.

3.4 AVALIAÇÃO HEPÁTICA POR IMAGEM

3.4.1 Ultrassonografia abdominal

A ultrassonografia com modo bidimensional (US) fornece informações acerca da morfologia das estruturas analisadas. No protocolo de investigação de pacientes com hepatopatia crônica são realizadas avaliações do fígado, do baço e de seus respectivos vasos, além de verificação da presença de esteatose, ascite e lesões focais hepáticas, como o CHC. [28]

O *color Doppler* associado a US (USD) permite a análise hemodinâmica dos vasos hepáticos e do tronco celíaco. Este instrumento possibilita a quantificação do fluxo vascular, bem como a detecção de vasos venosos colaterais e trombos. Estas alterações podem se desenvolver na vigência de hipertensão portal. [29]

3.4.2 Tomografia computadorizada e ressonância magnética

A avaliação por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) na cirrose hepática é valiosa para a caracterização de lesões focais ou

alterações vasculares visualizadas ao USD. Com estudo contrastado em 3 fases, lesões malignas como o CHC podem ser identificadas. A presença de realce por contraste na fase arterial precoce com lavagem rápida na fase portal deve ser considerada altamente suspeita de CHC. [30]

3.5 TRATAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA TERMINAL

3.5.1 Transplante hepático

A princípio um procedimento ousado e experimental, 4 décadas depois o transplante hepático é considerado a única opção estabelecida para prolongar a sobrevida de pacientes com insuficiência hepática grave, aguda ou crônica. Os dados mais recentes da UNOS (Rede Unificada de Compartilhamento de Órgãos) indicam taxas de sobrevida de 83%, 70%, e 61% após 1 ano, 5 anos e 8 anos, respectivamente. [31] O aperfeiçoamento das terapias imunossupressoras é significativo e hoje a perda do enxerto por rejeição crônica é rara. No entanto, a recorrência universal da infecção pelo VHC no enxerto e efeitos colaterais de longo prazo das drogas imunossupressoras (hipertensão, diabetes, dislipidemia, disfunção renal) são associados a morbi-mortalidade no período pós-transplante. [32]

Cabe ressaltar que o transplante hepático é um procedimento cirúrgico de vulto, que depende de infra-estrutura adequada e de equipe multidisciplinar com treinamento específico com alto custo para o sistema de saúde. Além disso, nem todos os pacientes são elegíveis para a cirurgia, devido a idade avançada, comorbidades, mau estado nutricional ou mesmo por progressão da doença. Em nosso meio, está indicado o transplante hepático quando o paciente atinge uma

classificação de CP B7 ou quando, classificado como CP A, apresenta episódio de HDA varicosa, EH, síndrome hepatopulmonar sintomática ou CHC. [33]

Ainda que o transplante hepático seja indicado, em todo o mundo vivemos em regime de carência de órgãos e um grande número de pacientes não sobrevive ao longo período de espera. A mortalidade em lista no Rio de Janeiro atingiu 49% no ano de 2003. [34] Alguns centros, como na Espanha, se dedicaram ao aperfeiçoamento do sistema de captação de órgãos e à expansão dos critérios de captação, obtendo aumento em 100% do número de doações após 10 anos de medidas intensivas. [35] No entanto, além de estarem fora de nossa realidade neste momento, tais medidas não foram suficientes para superar a demanda por enxertos no mundo e continua a busca por alternativas terapêuticas.

3.5.2 Outras terapias

Técnicas como o transplante de hepatócitos [36] e o suporte hepático artificial ou bioartificial [37] têm sido estudadas como tratamentos para a doença hepática terminal. As séries de pacientes relatadas são pequenas e fatores como a carência de órgãos para retirada de células funcionais e o custo dos equipamentos dificultam o aprimoramento e a popularização destes métodos, que ainda são considerados experimentais.

3.6 TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO

A pesquisa em terapia com células-tronco (CT) progride em nosso tempo com extraordinária rapidez e já surgiu gerando expectativas e conflitos. A capacidade das

CT embrionárias de se ‘transformarem’ em qualquer célula especializada do corpo humano sempre constituiu uma importante promessa para o campo da medicina regenerativa. No entanto, mesmo hoje um dilema ético permanece sem solução: o processo de obtenção destas células geralmente implica na destruição de um pré-embrião. A polêmica foi reforçada a partir de 1998, quando foram publicados os primeiros artigos documentando a obtenção de miócitos e hepatócitos a partir de células-tronco da medula óssea (CTMO). Estes primeiros estudos foram considerados verdadeiras quebras de paradigma e as CT adultas passaram a ser pesquisadas com intenções terapêuticas. [38] A dificuldade de expansão das CT embrionárias em meios livres de material animal assim como a tendência à formação de teratomas em modelos experimentais contribuem para retardar sua aplicabilidade *in vivo*. [5]

3.6.1 Definições

Células-tronco são células indiferenciadas que, através da replicação, possuem tanto a capacidade de auto-renovação como de diferenciação em células maduras especializadas. Existem basicamente dois tipos de CT: as de origem embrionária e as adultas. As CT embrionárias humanas são obtidas de blastocistos 4 a 5 dias após a fertilização, quando estes contêm de 50 a 150 células. [5]. Em cada tecido do organismo existe uma população específica de CT adultas. São responsáveis por gerar novas células especializadas, substituindo as danificadas ou senescentes, prezando então pela integridade do órgão. [39]

As CT também podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes segundo o seu potencial para diferenciação. O zigoto e as células

derivadas das primeiras mitoses são consideradas totipotentes, pois são capazes de gerar células derivadas do endoderma, mesoderma, ectoderma e também tecidos extra-embrionários como o trofoblasto. Células pluripotentes, como as derivadas da massa celular interna do blastocisto, podem dar origem a todas as células do embrião. CT que originam linhagens celulares de folhetos embrionários distintos são consideradas multipotentes. [40]

Acreditava-se que, em algum estágio precoce, as CT adultas sofressem uma modificação irreversível que as obrigasse a gerar apenas progenitores comprometidos com linhagens celulares de seu tecido. Entretanto, hoje sabemos que essa dedicação pode não ser absoluta e que diversas populações de CT adultas possuem capacidade multipotente. Esta propriedade de cruzar barreiras de linhagem e gerar célula madura de um folheto embrionário distinto é denominada plasticidade. O termo transdiferenciação, embora signifique transformação de uma célula já diferenciada em outra célula especializada distinta, é utilizado largamente como sinônimo de plasticidade na literatura referente a células tronco adultas. [40]

3.6.2 Células-tronco derivadas da medula óssea

Devido à dificuldade de obter números expressivos de CT adultas locais a partir de certos tecidos (cérebro, coração, fígado), o foco da pesquisa translacional voltou-se para populações de CT mais acessíveis, como o sangue de cordão umbilical, a placenta, o tecido adiposo e a medula óssea (MO). A MO é um órgão de elevada complexidade e contém vários tipos de células progenitoras.

As CT hematopoiéticas (HSC) constituem a população multipotente melhor caracterizada atualmente. [40] São capazes de diferenciação em todas as linhagens

de células maduras do sangue e expressam, entre outros marcadores, CD45, CD34, CD133 e c-kit. Podem ser obtidas tanto por aspiração da MO na crista ilíaca como por mobilização com G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*). O G-CSF é uma citocina com potente capacidade de mobilização de células da MO, incluindo CT, para o sangue periférico. Posteriormente, essas células podem ser coletadas por aférese. As HSC também podem ser extraídas, em menor número, do sangue de cordão umbilical. [5]

Quando células de um aspirado de MO são colocadas em cultura, uma fração pode ser separada pela propriedade de aderência ao plástico. Desta fração, é derivada uma população heterogênea que inclui células mesenquimais e estromais da MO, e caracteriza-se pela formação de colônias com morfologia semelhante a fibroblastos em cultura. As células-tronco existentes nesta população são denominadas células multipotentes mesenquimais estromais (MSC) e possuem ampla plasticidade. Tipicamente dão origem a adipócitos, osteócitos e condrócitos sob estímulos apropriados e relatos mais recentes indicam que são capazes de gerar linhagens epiteliais e derivadas do neuroectoderma. [41] Como as MSC não possuem um fenótipo específico e podem ser extraídas de vários tecidos através de diferentes métodos, foram recomendados critérios mínimos para uniformizar a definição de MSC em humanos. [42] As MSC podem ser expandidas em cultura a partir da fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) para uso clínico. [43]

Outro tipo de CTMO com grande potencial de aplicação clínica é a população de células progenitoras/tronco endoteliais (EPC). Possuem um precursor em comum com as HSC, o hemangioblasto, e contribuem para o reparo tecidual em vários órgãos através da angiogênese. [44] Diversas outras populações já foram isoladas

da MO, como as *side population cells*, caracterizadas pela exclusão do corante Hoechst, e as células progenitoras multipotentes adultas (MAPC). Entretanto, o isolamento e caracterização destas populações é pouco reprodutível, o que compromete sua aplicabilidade.

3.6.3 Mecanismos de regeneração tecidual

Existem extensas evidências pré-clínicas respaldando o princípio da regeneração tecidual de tecidos não-hematopoiéticos a partir de CTMO. [45-48] Na última década, diversos estudos elegantes documentaram a capacidade de diferenciação das CTMO em células neurais, [46] músculo cardíaco [47] e esquelético, [49] pele [50, 51] e hepatócitos. [48, 51-55] Em 2000, dois grupos publicaram de forma independente o achado de hepatócitos positivos para o cromossomo Y em receptoras femininas de transplante de MO de indivíduo masculino. De forma inversa, pacientes masculinos receptores de enxerto hepático de doador feminino também apresentaram um pequeno número de hepatócitos positivos para o cromossomo Y. [52, 55] Mezey *et al*, estudando mulheres que haviam recebido transplantes de MO de indivíduos do sexo masculino, demonstraram ainda que células da MO podem penetrar no sistema nervoso e se diferenciar em neurônios. [46]

Verificou-se também que as HSC são capazes de sofrer expansão, deixar o seu nicho na MO e migrar para outros órgãos em resposta a lesão tecidual. Enzimas proteolíticas (MMP) e citocinas são liberados na circulação e a MMP-9, em particular, degradam o fator derivado de célula estromal-1 (SDF-1) presente na MO. É criado um gradiente de concentração de SDF-1 entre a MO e o órgão lesado que

estimula a liberação das CTMO, através da interação entre o SDF-1 e seu receptor, o CXCR4. Ocorre, então, a migração e captação das CTMO no tecido alvo. No fígado, o recrutamento das HSC é facilitado pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e pela interleucina-8. No caso específico do recrutamento de MSC para o fígado, isto não está bem caracterizado e ainda não foi estudado *in vivo*. [6, 56]

Devemos frisar que diversos grupos, incluindo a nossa instituição, não encontraram contribuição significativa das CTMO para a regeneração tecidual em modelos animais de cirrose. [57-59] Em alguns destes estudos, quando houve benefício, a regeneração celular foi tão pequena que não poderia explicar a melhora funcional. Mais ainda, por detrás da aparente transdiferenciação, o que ocorreria seria a simples fusão das CTMO com células nativas, resultando em restauração total ou parcial de suas funções. [60, 61] Além da fusão, outros mecanismos postulados para o reparo tecidual relacionado à CTMO envolvem liberação de fatores de crescimento e citocinas, imunomodulação e angiogênese. Esta complexa interação entre as CTMO e o microambiente do tecido-alvo recebe a denominação genérica de 'efeito parácrino' e constitui o foco principal das investigações hoje. Naturalmente, há um longo caminho a ser percorrido até que possamos compreendê-lo de forma satisfatória. [56]

3.6.4 Aplicação clínica

Ensaio clínico preliminar apresentou resultados animadores e demonstraram a segurança da terapia com CTMO em cardiomiopatia isquêmica, [62, 63] insuficiência arterial periférica, [64] acidente vascular encefálico, lesão da medula espinhal [65] e recentemente em doenças hepáticas. Ainda não estão

definidos quais tipos de CTMO são mais apropriados para intervir em cada doença e os protocolos clínicos ainda são bastante heterogêneos. Particularmente em doenças autoimunes, incluindo o diabetes mellitus tipo 1, o fundamento não é regenerar um órgão lesado com células progenitoras, mas sim substituir o sistema imunológico através de quimioterapia ablativa antes da infusão das CTMO. Pela semelhança com o clássico transplante de células hematopoiéticas (HSCT) para o tratamento de doenças malignas, a taxa de mortalidade e o potencial de complicações como a doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) são fatores limitantes para a aplicação mais ampla destes protocolos. [5]

3.6.5 Avaliação da cinética celular

O rastreamento do destino biológico das CT infundidas *in vivo* é fundamental para a avaliação dos efeitos e mecanismos de ação destas células, e principalmente para o estudo da melhor via de infusão. No momento, as técnicas de maior potencial envolvem marcação com radioisótopo, nanopartículas ferromagnéticas, manipulação de genes específicos e uso da tomografia com emissão de pósitrons. [66] Os estudos de marcação celular em modelos animais e em humanos encontram-se mais avançados no campo da terapia celular em cardiologia e ainda não existem estudos que abordem a cinética celular em humanos com cirrose hepática. Goussetis *et al* constataram, curiosamente, que menos de 10% do radiotraçador foi detectado em áreas de infarto do miocárdio infundidas com CT marcadas. O restante da marcação distribuiu-se principalmente entre fígado e baço. [67] Gutfilen *et al.* desenvolveram técnica original no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF/UFRJ para marcação de CMMO com Tecnécio-99m (99mTc) [58, 59]

utilizada atualmente em nossos protocolos clínicos. Dados preliminares dos grupos de Terapia Celular em Cardiologia e Neurologia de nossa instituição indicam que, mesmo com infusão de CTMO em sítios distantes como artérias coronárias ou artéria cerebral média, o fígado reteve a maior parte das células marcadas.

3.7 CÉLULAS-TRONCO EM HEPATOLOGIA

3.7.1 Células-tronco hepáticas

Ao contrário do que ocorre em outros tecidos como a pele e o intestino, em situações de lesão ou ressecção a massa hepática não é reconstituída principalmente pela população local de CT, e sim através da divisão de hepatócitos maduros. [1] Alguns autores chegam a considerar o hepatócito como a 'célula-tronco funcional' do fígado, por sua capacidade de expansão clonal praticamente ilimitada e pela responsabilidade de renovação do parênquima na maioria das circunstâncias. [6, 68]

Quando a replicação hepatocitária está comprometida por senescência, lesão hepática crônica ou, experimentalmente, por substâncias inibidoras da mitose, o compartimento de CT adultas locais assume o papel regenerativo. [69] Estas CT pouco diferenciadas são denominadas células ovais em ratos e células progenitoras hepáticas (HPC) em humanos. Estão localizadas na vizinhança dos canais de Hering e são bipotenciais. A origem desta população é controversa e já foi aventada a contribuição de CTMO [48] e de progenitores hepáticos endógenos. [70, 71] Um modelo conhecido para eliciar a resposta das CT locais é a administração de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) seguida por hepatectomia parcial. A droga impede a

entrada dos hepatócitos no ciclo celular em resposta à ressecção. Consequentemente, a pressão regenerativa é deslocada para as CT locais, resistentes ao 2-AAF. A amplificação destas células produz uma reação ductular que culmina na produção de hepatócitos e colangiócitos.

3.7.2 Mecanismos de interação

O transplante de CTMO em modelo de ratos fumaril acetoacetato hidrolase *knockout* (FAH(-/-)), que reproduz a tirosinemia hereditária tipo 1, evidenciou a geração de hepatócitos FAH-positivos por fusão com progenitores da MO. [53, 60, 61] Foi obtida repopulação do fígado e correção de uma deficiência enzimática fatal através da terapia com CTMO, o que gerou bastante expectativa. No entanto, em tentativas de reproduzir o experimento a formação de novos hepatócitos ocorreu em nível muito pequeno para ser valorizado [60] e este resgate ocorreu principalmente por fusão de monócitos derivados da MO com os hepatócitos doentes. [72] Ademais, a pressão seletiva que ocorre neste tipo de modelo para manter a expansão celular é de improvável ocorrência *in vivo*. [73]

Ao invés de buscar a produção de células funcionais, outros grupos voltaram o foco de investigação para o efeito das CTMO no remodelamento da fibrose hepática avançada. Além da perda de função hepatocitária, a hipertensão portal decorrente da fibrose responde por grande parte das complicações clínicas. Estudos experimentais verificaram a redução da fibrose após infusão de CTMO durante indução de lesão hepática, [74-76] o que é muito animador, porém este efeito não foi reproduzido no modelo animal desenvolvido em nossa instituição. [58, 59]

3.7.3 Controvérsias

Questionamentos pertinentes sobre possíveis efeitos das CTMO no fígado, como riscos de piora da fibrose e aumento da incidência de CHC, ainda não foram esclarecidos de forma satisfatória. [6] Apesar da atenção inicial dos pesquisadores ter estado voltada para o efeito das CTMO sobre os hepatócitos, diversos grupos identificaram que a maior parte da influência das CTMO infundidas ocorria sobre macrófagos, células estreladas e miofibroblastos, envolvidos na geração de tecido fibrótico no fígado. Dados em animais e humanos apontam que as CTMO contribuem funcionalmente para a piora da fibrose hepática *in vivo* ao gerar células estreladas e miofibroblastos. Isto seria especialmente preocupante no caso das MSC. [77-79]

É discutível se a infusão de células do próprio indivíduo, minimamente manipuladas, poderia causar câncer, mas existe substrato para controvérsias. Certos autores consideram o câncer como uma 'doença de células-tronco'. As CT locais seriam as únicas capazes de persistir no tecido por tempo suficiente para acumular as alterações genéticas consecutivas necessárias à carcinogênese. [80] No caso do fígado e de seu tumor primário mais frequente, o CHC, além de uma população local de CT bipotenciais (as HPC), suas próprias células funcionais são dotadas de longevidade e potencial de replicação a longo prazo. Portanto, existiria mais de uma célula-alvo carcinogênica. [81] Além disso, Petersen *et al* relataram há 10 anos que CTMO circulantes contribuem para o reservatório de HPC. [48] Já discutimos que quando há repopulação hepática pelas CTMO, o principal mecanismo é a fusão com células locais, levando a aneuploidia e instabilidade cromossômica. [73] Kashofer *et al* também demonstraram a formação de

heterocárions instáveis ao infundir HSC humanas em ratos. [82] Apesar destes fatos, ainda não há evidência da participação direta de CTMO na formação de tumores [80] e tampouco da contribuição da terapia com CTMO para o aumento da incidência de CHC na cirrose hepática.

3.7.4 Tipos celulares e aplicabilidade

Existem múltiplos mecanismos propostos para explicar a ação das CTMO sobre o fígado, como transdiferenciação, fusão, angiogênese, imunomodulação, redução da fibrose, estímulo à proliferação celular. Na prática, o pesquisador escolherá para sua investigação o tipo de CTMO com o qual possui experiência prévia ou que está associado, na literatura, ao mecanismo de ação no qual tende a acreditar. [6]

O balanço atual das evidências sugere que em situações de lesão hepática grave ou repetida as HSC contribuem de forma modesta para a geração de hepatócitos, e principalmente por fusão celular. [73] Entretanto, esta população parece fornecer citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação hepatocitária através de mecanismos parácrinos. [83, 84]

A capacidade de transdiferenciação das MSC em células hepatócito-*like* já está estabelecida. [85, 86] Todavia, os dados sobre a diferenciação *in vivo* da MSC são contraditórios, com grupos proeminentes verificando resultados positivos [87-89] e negativos. [57] Existem evidências crescentes a favor do efeito imunomodulatório das MSC, [90] e parece interessante a idéia de que possam modular a inflamação do tecido hepático, atenuando a deposição de colágeno e reduzindo as complicações das hepatopatias. Apesar das promessas, estudos em ratos indicam a

contribuição da MO para a formação de miofibroblastos em vários órgãos, incluindo o fígado, [77] e di Bonzo *et al* verificaram *in vivo* a transformação de MSC em miofibroblastos nas áreas de tecido cicatricial. As MSC apresentavam uma probabilidade maior que dez vezes de gerar miofibroblastos que células hepatócitos-*like*. [91]

Já foi sugerido que a fusão monócito-hepatócito seria suficiente para garantir a repopulação do fígado, não sendo necessária a presença das HSC. [72, 84] Mais ainda, as células mononucleares derivadas da MO (CMMO) parecem possuir a capacidade de remodelar o tecido fibrótico hepático. [92] Considerando que a fração mononuclear da MO é um conjunto de diferentes tipos celulares (HSC, linhagem mielomonocítica, MSC, EPC) ainda não está claro qual tipo celular estaria atuando ou mesmo se haveria sinergismo entre populações.

3.7.5 Estudos clínicos

A maior parte dos estudos clínicos com CTMO em hepatologia já publicados são pequenos e não controlados. Segundo o site gerido pelo NIH ClinicalTrials.gov, que contém o registro de nosso estudo, ensaios clínicos são 'estudos de pesquisa biomédicos ou relacionados à saúde realizados em seres humanos, que seguem um protocolo pré-definido'. O grupo controle não é obrigatório. As fases mais precoces de um ensaio clínico 'avaliam uma droga ou tratamento experimental'. Na fase I, o tratamento é testado em um grupo pequeno de indivíduos para avaliar segurança, identificar efeitos adversos e determinar uma janela segura de dosagem. Na fase II, o tratamento é aplicado a um grupo maior de pessoas para avaliação da eficácia e melhor avaliação de segurança. [93] Quando o ensaio clínico avalia o efeito de um

medicamento, a fase I pesquisa a farmacocinética e a segurança da droga em indivíduos saudáveis. A eficácia, posterior análise de segurança e dose ideal em pacientes enfermos só são avaliadas na fase II. [94]

Até o momento, temos conhecimento de 20 estudos clínicos investigando efeitos das terapias com CTMO em hepatopatias. [95-113] Há pontos-chave a serem questionados para cada estudo: a finalidade, a escolha do tipo celular, a fenotipagem do material infundido, o rastreamento das células após a infusão e a definição de desfechos apropriados. Houlihan *et al* realizaram em 2008 uma análise crítica dos ensaios clínicos publicados na área até então. Nesta revisão, os estudos foram didaticamente separados em 4 grupos: [6]

- a) mobilização de CTMO com G-CSF;
- b) infusão de CTMO autólogas;
- c) mobilização com G-CSF, coleta e infusão de CTMO
- d) infusão de CTMO visando viabilização de hepatectomia.

Outros estudos não foram incluídos em sua revisão e optamos por descrevê-los. [100, 102, 106, 108-110, 112, 113]. Os estudos mais relevantes abordando especificamente CTMO autólogas na cirrose hepática em adultos serão comentados em separado e encontram-se resumidos na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Ensaios clínicos: CTMO autólogas na cirrose hepática

| Referência | n | etiologia | fonte | tipo celular | contagem | via | ΔT | resultados | observações |
|------------------------------|----|---|----------------------------|----------------------------------|--|----------------|-----------|---|--|
| Gaia [95] | 8 | 5 OH, 3 cripto | G-CSF | NA | NA | NA | 5-17 m | melhora EH, ascite ↓ discreta CP e MELD | aumento transitório do baço |
| Di Campi [99] | 24 | 4 VHB, 12 VHC, 8 OH | G-CSF | NA | NA | NA | 1 m | avaliou <i>oming</i> sem melhora | 30% dor óssea (G-CSF) randomizado, controlado |
| Lorenzini [111] | 18 | 2 VHB*, 14 VHC*, 3 OH | G-CSF | NA | NA | NA | 1 m | não aumentou baço sem melhora | analisou e criopreservou células |
| Spahr [105] | 24 | OH | G-CSF | NA | NA | NA | 7 d | ↑ > 50% nas HPC no tecido sem melhora | randomizado, controlado |
| Terai [97] | 9 | 3 VHB, 5 VHC, 1 cripto | aspirado MO | CMMO | $5,2 \pm 0,63 \times 10^8$ | AP | 6 m | melhora albumina, CP febre pós infusão | biópsias em 3 pacientes |
| Lyra [102] | 10 | 5 VHC*, 5 OH*, 1 cripto, 1 colestase | aspirado MO | CMMO | $4,2 \times 10^8$ | AH | 4 m | ↓ 24% da BT ↑ albumina em 7% | não avaliou CP ou MELD |
| Khan [112] | 4 | 1 VHB, 3 VHC, | G-CSF aspirado MO | CD34+ | 1×10^7 | AH | 6-12 m | melhora albumina, BT CP B → A em 3 pacientes | |
| Mohamadnejad [103] | 4 | VHB, CBP, HAI, cripto | aspirado MO | CD34+ | $5,25 \times 10^8$ | AH | 6 m | melhora INR, albumina, MELD BT pior na CBP | 1 óbito (nefropatia pós contraste) |
| Mohamadnejad [106] | 4 | 3 cripto, 1 HAI | aspirado MO | MSCs expandidas | $31,7 \times 10^8$ | AP | 12 m | melhora em 2 pacientes: MELD, albumina, INR | |
| Gordon [96] Levicer [104] | 5 | 1 VHB, 2 VHC*, 2 OH*, CEP | G-CSF aférese | CD34+ plástico-aderentes | $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ | VP ou AH | 6-18 m | ↓ BT aos 6 m ↑ albumina em 4 pacientes | plaquetopenia transitória (aférese) |
| Yannaki [98] | 2 | OH | G-CSF aférese, 3 cbllos | CD34+ | $2,31 \text{ e } 4 \times 10^8 \text{ kg}$ | AP | 34 / 30 m | melhora MELD e CP | hipotensão limitou aféreses no paciente 1 |
| Han [107] | 40 | VHB | G-CSF c/e s/ aférese | NA / monócitos mobilizados | NA | NA ou AP | 6 m | melhora albumina e INR grupo aférese melhor | randomizado |
| Pai [108] | 9 | OH | G-CSF aférese | CD34+ expandidas | $2,3 \times 10^8$ | AH | 3 m | ↓ BT CP ↓ em 7 pacientes | |

*sobreposição de etiologias. VHB, vírus da hepatite B; VHC, vírus da hepatite C; OH, álcool; CBP, cirrose biliar primária; HAI, hepatite auto-imune; cripto, criptogênica; G-CSF: *granulocyte colony stimulating factor*; CMMO: células mononucleares de medula óssea; MSC: célula tronco mesenquimal estromal; CP: escore Child-Pugh; BT: bilirrubina total; MO, medula óssea; AP, acesso periférico; VP, veia porta; AH, artéria hepática; EH: encefalopatia hepática; INR: *International Normalized Ratio*; MELD: *model for end-stage liver disease*; CEP: colangite esclerosante primária; NA, não aplicável.

Mobilização de CTMO com uso de G-CSF

O racional para a terapia com G-CSF na doença hepática crônica baseia-se em estudos experimentais que verificaram um efeito regenerativo da droga sobre o fígado. Isto foi demonstrado em modelos de hepatectomia parcial [114] e de agressão aguda e crônica com CCl₄. Neste último, a promoção de mecanismos de reparo tecidual endógenos parece ser o mecanismo principal. [83]

Gaia *et al* investigaram a exequibilidade, segurança e caracterização das CTMO após mobilização com G-CSF em cirrose hepática avançada. [96] Oito pacientes com classificação de CP B e C e diâmetro esplênico menor que 17 cm foram tratados com G-CSF (10 mcg/kg/dia por 3 dias) para induzir mobilização de CTMO. Cinco sujeitos apresentavam cirrose de etiologia alcoólica com tempo mínimo de abstinência de 12 meses, e os demais, cirrose criptogênica. Pacientes em lista de transplante não foram incluídos. Foi confirmada a mobilização das CT em todos os pacientes através da quantificação de células CD34+ e CD133+ no sangue periférico antes e após o uso de G-CSF. Os dados de mobilização e caracterização de CTMO foram comparados com controles saudáveis (doadores de células hematopoiéticas) e o número de células mobilizadas em pacientes com cirrose foi significativamente menor. Isto foi atribuído tanto à presença de hiperesplenismo quanto à disfunção medular que ocorre na insuficiência hepática, especialmente alcoólica. Ao final do seguimento (mediana, 8 meses; variação 5-17 meses), a classificação de CP melhorou em 2 ou mais pontos em 4 pacientes, piorou em 1 paciente e continuou estável nos 3 restantes. O escore MELD melhorou, de uma mediana de 17,5 (variação: 11-20) para 14,5 (variação 9-20). Foi observada melhora clínica em 6 pacientes (redução da ascite em 4 pacientes e dos episódios de EH em 2 pacientes). Um paciente foi submetido a 2 ciclos de G-CSF, com melhora de CP

de C11 para B9 e daí para B8, sem eventos adversos, chamando a atenção para a viabilidade de repetição do procedimento. O aumento do diâmetro do baço induzido pelo G-CSF foi significativo, no entanto não houve rotura esplênica em nenhum paciente, sugerindo a segurança da droga. Críticas a este estudo, assim como a quase todos os outros, são o curto tempo de seguimento, a ausência de grupo controle de pacientes com cirrose e o uso de critérios subjetivos de avaliação de melhora (ascite e EH). A ausência de esclarecimento do mecanismo de ação envolvido e a impossibilidade de diferenciar o benefício do efeito placebo são típicos dos primeiros estudos clínicos realizados em fígado.

A segurança de doses crescentes de G-CSF foi avaliada por Lorenzini *et al* em 8 pacientes com cirrose hepática em avaliação para transplante. [112] Em 3 outros pacientes, foi examinada a exequibilidade de sessão única de leucoaférese para coleta de CTMO do sangue periférico e a eficácia do G-CSF em mobilizar células CD34+ e CD133+. A dose ótima de G-CSF para este fim foi de 15 mcg/kg/dia por 7 dias. Em apenas 8 dos 18 pacientes foi atingida mobilização efetiva, e este fato não apresentou correlação com idade, etiologia, tamanho do baço ou gravidade da doença. A média de células CD34+ e CD133+ coletadas foi de $1,3 \pm 0,7$ e $1,2 \pm 0,5 \times 10^6 / \text{kg}$, respectivamente, que foram destinadas à criopreservação sem intenção de reinfusão. Foi confirmada a baixa capacidade de mobilização dos pacientes cirróticos em comparação com controles saudáveis constatada por Gaia *et al*. Em doses de G-CSF > 6,6 mcg/kg, foi observada dor óssea (67%) e febre (25%). Houve aumento de FA sem alteração de outros marcadores de colestase. Uma redução inesperada de AFP em todos os pacientes não encontrou correlação com outros parâmetros. Não foi verificado aumento do baço à USD e a leucoaférese foi bem tolerada. Não foi verificada mudança na

função hepática ou nos níveis séricos de SCF (*stem cell factor*), SDF-1 ou fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF). Todavia, os níveis de HGF elevaram-se em comparação aos controles saudáveis, principalmente nos pacientes que receberam a dose mais alta de G-CSF.

Di Campli *et al* selecionaram 24 pacientes com insuficiência hepática crônica descompensada (por HDA, ascite ou EH), que foram randomizados para receber 5 ou 15 mcg/kg/dia de G-CSF por 6 dias. [100] A capacidade do G-CSF de mobilizar células CD34+ nos pacientes estudados foi confirmada, após comparação com controles sadios. O efeito adverso relatado mais marcante foi dor óssea, em 30% dos pacientes e controles. A terapia mostrou-se segura mesmo nas doses maiores, que foram associadas a melhores taxas de mobilização, tornando atraente a coleta de CTMO no sangue periférico. No entanto, não foi demonstrada melhora funcional ou bioquímica nos pacientes tratados. Um ponto interessante foi a correlação positiva da mobilização celular com a expressão de receptores de superfície relacionados ao *homing*, como o receptor do SDF-1 (CXCR4), receptor de VEGF tipo 1 (VEGFR-1) e *very late antigen type 4* (VLA-4).

Spahr *et al* estudaram os efeitos a curto prazo do G-CSF na mobilização de CT CD34+, na proliferação de células hepáticas e na função hepática de pacientes com esteato-hepatite e cirrose alcoólicas. [106] Vinte e quatro pacientes com média de idade de 54 anos, escore CP de 7 a 12 (média 10) e esteato-hepatite alcoólica comprovada por biópsia foram randomizados para receber G-CSF 10 mcg/kg/dia por 5 dias (n = 13) ou tratamento convencional (n = 11). O G-CSF foi bem tolerado. As biópsias foram repetidas ao dia 7 de seguimento e as HPCs proliferantes (dupla marcação Ki67/citoqueratina 7), aspecto histológico e neutrófilos foram reavaliados. Pacientes com cirrose alcoólica em abstinência foram utilizados como controles para

a análise imunohistoquímica. Neutrófilos e alterações histológicas foram similares nos dois grupos. Foi verificado um aumento maior que 50% nas HPCs proliferantes na biópsia do dia 7, e as mudanças observadas nas células Ki67+/citoqueratina 7+ acompanharam as mudanças nas células CD34+. Estes achados não foram traduzidos em melhora funcional.

Infusão de CTMO autólogas

Após o estudo experimental de seu grupo em que a infusão de CTMO elevou níveis de albumina, reduziu fibrose hepática e comprovou transdiferenciação em hepatócitos, [74] Terai *et al* incluíram 9 pacientes com cirrose hepática em um estudo clínico no Japão. [98] A média de idade foi de 62 anos, a etiologia foi principalmente HBV ou HCV e o escore CP variou entre 7 e 10. Foram aspirados 400 mL de MO da crista ilíaca, de onde foi isolada a fração de CMMO e infundida em veia periférica (média de $5,2 \times 10^9$). Todos os pacientes apresentaram febre após a infusão celular, que pode ser atribuída à contaminação do material com neutrófilos. Os pacientes foram acompanhados por 6 meses e foi relatada elevação significativa dos valores de albumina e queda do peptídeo pró-colágeno III (PIIIP) ao final do período. Houve queda mínima do valor médio do escore CP de 8,4 para 7,4. Foram realizadas biópsias hepáticas guiadas por US em 3 pacientes antes da infusão e ao final do primeiro mês. A análise imunohistoquímica para AFP e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) mostrou aumento evolutivo da expressão, sugerindo que a regeneração hepática foi intensificada.

Lyra *et al* [103] aplicaram protocolo bastante semelhante ao utilizado nesta dissertação, em 10 pacientes com cirrose hepática e indicação de transplante.

Foram aspirados 50 mL de MO da crista ilíaca, e separada a fração de CMMO do material por centrifugação em gradiente de Ficoll–Paque. A infusão foi realizada por cateterismo e arteriografia de tronco celíaco. Os pacientes foram avaliados 1 e 4 meses após a infusão. O nível médio de BT caiu 21% no mês 1 e 24% no mês 4 em comparação com os valores de base. O valor médio da albumina elevou-se em 7% ao final do seguimento. O INR não apresentou mudanças significativas (queda de 3%). Um episódio de EH foi relatado em paciente com outros eventos prévios. O uso de CMMO não separadas certamente não ajuda no esclarecimento do tipo celular responsável pela melhora. O mesmo grupo ampliou a coleta de dados anterior e divulgou em congresso um estudo envolvendo 30 pacientes, em que 15 fizeram parte de um grupo controle. [111] Os pesquisadores relataram que este grupo foi criado por randomização, sem mascaramento, com tempo de seguimento de 3 meses. Os resultados referentes a albumina e INR foram semelhantes ao estudo anterior, porém desta vez o escore de CP foi avaliado. Houve redução de 8% no grupo tratado comparada com aumento de 2% no grupo controle, ao final do seguimento. Este relato consiste em um resumo apresentado em congresso e desconhecemos sua publicação em revista indexada. Por carência de dados, sua interpretação e valorização ficam prejudicadas.

Em um estudo pediátrico pioneiro, Gupta *et al* realizaram infusão de CMMO em 12 pacientes com cirrose hepática e 17 com meningomielocelose. [102] No braço das hepatopatias, as etiologias foram atresia de vias biliares, colestase neonatal e cisto de colédoco. As idades variaram entre 1,5 e 9 meses. Foram utilizadas CMMO separadas da MO, aspirada da crista ilíaca. As células CD34+ foram contadas apenas (média de 3×10^7), e infundido o total das CMMO isoladas na artéria hepática ou veia porta. Houve 5 óbitos, atribuídos a evolução da doença, e a

evolução dos pacientes restantes foi considerada favorável durante o seguimento (3 a 12 meses). Três pacientes foram submetidos a biópsia no sexto mês pós infusão e apresentaram melhora histológica da fibrose.

Khan *et al* assumiram uma estratégia diferente [113] e realizaram mobilização com G-CSF antes da aspiração de MO. Em 4 pacientes com cirrose por hepatite viral (3 HCV, 1 HBV) foram separadas as células CD34+ e infundidas na artéria hepática. Náusea, vômito e dor local foram os únicos eventos adversos pós arteriografia. O seguimento foi de 6 meses a 1 ano. Foi observada queda dos níveis de BT assim como elevação da albumina em 3 pacientes.

Um grupo da Universidade de Teerã selecionou 4 pacientes com cirrose descompensada, em lista de transplante hepático, para receber infusão de CTMO autólogas. [104] Infecção pelo VHC e história de uso de álcool foram considerados critérios de exclusão. A média de idade foi 47,75 anos (40-53). Foram aspirados 200 mL de MO da crista ilíaca e a fração de CMMO foi enriquecida com células CD34+. Cada paciente recebeu em média $5,25 \times 10^6$ células CD34+, infundidas na artéria hepática. Um paciente apresentou piora da função renal 5 meses após o procedimento, e a correlação entre os dois eventos não está clara. O paciente 4 desenvolveu insuficiência renal logo após o procedimento e faleceu antes de realizar o transplante hepático. Os pacientes restantes foram acompanhados por 6 meses, e apesar das tendências de elevação da albumina (3,07 para 3,37 mg/dL) e redução do TAP (17,8 para 16,1 s), o escore MELD aumentou de 16 para 17 ao final do seguimento. Após o óbito do paciente 4, a inclusão de novos sujeitos foi interrompida. Neste caso, a piora da função renal pôde ser atribuída ao uso de contraste iodado utilizado no método de infusão das CT na artéria hepática

(arteriografia de tronco celíaco). A paciente possuía ascite tensa, fator de risco para SHR, e níveis de Cr pré procedimento de 1,37 mg/dL.

Um estudo recente conduzido pelo mesmo grupo incluiu o mesmo número de pacientes e manteve os critérios de inclusão e exclusão. [107] Após separação das CMMO, foi selecionada uma população de MSC e expandida *ex vivo* por cultura. Um paciente apresentava hepatite auto-imune inativa e os 3 restantes, cirrose criptogênica. O volume aspirado da MO, por anestesia local, foi menor (80-100 mL). Após a infusão periférica das MSC em 30 minutos, os pacientes foram liberados no mesmo dia, em um interessante desenho de intervenção ambulatorial. O grupo optou pelo uso de antibiótico profilático (vancomicina, 1g) devido à manipulação prolongada do material por mais de uma semana. A média de MSC infundidas foi de $31,7 \times 10^6$ e o tempo de seguimento foi estendido para 12 meses. A média do escore MELD de base foi de 23, caindo para 20 ao final do estudo. A volumetria hepática foi avaliada e aumentou evolutivamente em 3 pacientes. Questionários Short Form-36 também foram aplicados e houve melhora de qualidade de vida em todos os pacientes. O fato de todos os pacientes terem permanecido vivos e com escore MELD melhorado por 1 ano, em lista de transplante, são animadores enquanto valorização da terapia regenerativa como ponte para o transplante. No entanto, deve ser mantida cautela quanto ao uso clínico de MSC com fins de regeneração tecidual.

Mobilização com G-CSF, coleta e infusão de CTMO

Após mobilização com G-CSF, Gordon *et al* isolaram do sangue periférico de 5 pacientes com cirrose hepática fora de critérios para transplante uma subpopulação de células CD34+ aderentes ao plástico. [97] Ao serem expandidas

em cultura, estas células expressaram diversos genes associados a diferenciação em hepatócitos. Também demonstraram múltipla capacidade de diferenciação *in vitro* típica de CT/progenitoras. Estes pacientes foram incluídos em um estudo de fase 1 investigando segurança e exequibilidade da infusão autóloga destas células após mobilização de G-CSF (520 mcg/dia por 5 dias) e leucoaférese. Receberam 1×10^6 a 2×10^8 células através da veia porta (3 pacientes) ou da artéria hepática (2 pacientes). Todos os pacientes apresentaram plaquetopenia, como pode ocorrer após a leucoaférese, revertida espontaneamente após 1 semana. Foi publicado em seguida um estudo relatando o seguimento destes pacientes em 12 meses, por Levicar *et al.* [105] Houve tendência à queda dos níveis de bilirrubina e aumento da albumina (2,9 para 3,3 mg/dL), com sobrevida de todos os pacientes até o final do seguimento. O grupo tomou um passo à frente e acrescentou ao protocolo a expansão em cultura de células CD34+. [109] Neste estudo, foram incluídos apenas pacientes com cirrose de etiologia alcoólica (n = 9) e abstêmios há pelo menos 6 meses. A expansão durou 7 dias, foi considerada exequível e amplificou a contagem de células CD34+ em 5 vezes. Optou-se pela infusão na artéria hepática (ramo direito) para assegurar o *homing* celular. O seguimento foi de 3 meses, com queda dos níveis de BT e CP. USD e TC demonstraram resolução da ascite em 3 pacientes, possibilitando a suspensão do diurético em 2 deles. Não foi avaliado o escore MELD. Não houve eventos adversos além de dor no local da infusão e plaquetopenia pós aférese.

Yannaki *et al* reportaram 2 pacientes com cirrose alcoólica descompensada que receberam infusões periféricas de células autólogas mobilizadas com G-CSF. A dose administrada foi de 10 mcg/kg/dia por 4 a 5 dias, seguida por leucoaférese. As células CD34+ foram identificadas no material infundido, mas não foram separadas e

os pacientes receberam células não selecionadas. O paciente 2 foi submetido a 3 sessões de mobilização, sendo que no primeiro paciente a leucoaférese não foi bem tolerada por hipovolemia. Houve aumento do baço em ambos os pacientes em 3 das 6 sessões de mobilização, sem rotura, e foi citado o estudo de Gaia como referência de segurança. Também neste estudo houve mobilização menor que a desejável de células CD34+. Houve melhora dos escores CP e MELD ao final do seguimento. Para o paciente 1, de 12 e 23 para 9 e 17, respectivamente; para o paciente 2, de 8 e 14 para 7 e 9, respectivamente. Houve ainda redução marcante no número de internações. A melhora clínica foi associada à redução da interleucina 6 e receptor 1 solúvel do fator de necrose tumoral, citocinas associadas a pior prognóstico na cirrose alcoólica. Foi sugerido o aumento da angiogênese hepática, devido à elevação dos níveis VEGF observados no paciente 1. O paciente 1 não foi biopsiado devido a coagulopatia, e no paciente 2 não foi verificada melhora da fibrose em biópsias hepáticas 1 e 2 anos após o protocolo. É difícil determinar se a melhora marcante apresentada pelo paciente 2 pode ser atribuída à terapia celular ou à interrupção do consumo de álcool 8 meses antes da inclusão no protocolo. Foi sugerido pelo revisor um período maior de abstinência para assegurar a validade dos efeitos do procedimento.

Yan *et al* estudaram em pacientes com cirrose descompensada por HBV a diferenciação de monócitos de sangue periférico em hepatócitos. [110] Em um estudo piloto com 2 pacientes, foi demonstrada melhora clínica persistente por mais de um ano após o procedimento, o que motivou um ensaio clínico com 40 pacientes (31 masculinos e 9 femininos, idade 21-71 anos), randomizados em 2 grupos. [108] O grupo 1 recebeu mobilização com G-CSF, coleta por leucoaférese e infusão de monócitos mobilizados do sangue periférico. O grupo 2 recebeu apenas mobilização

com G-CSF por 4 dias. Após 6 meses de seguimento, foi observada em ambos os grupos melhora dos níveis de albumina e do TAP. Não houve mudança significativa dos níveis de BT. No grupo 2, os níveis de albumina foram mais altos e também houve redução do CP. Segundo os autores, não houve eventos adversos graves.

Neste último subgrupo de estudos, apesar da diversidade entre etiologias da cirrose e da fração celular escolhida, todos relataram alguma melhora da função hepática. A expansão das células CD34+ em cultura [109] foi uma forma de contornar o problema da baixa mobilização celular na cirrose, embora a expansão de células seja dispendiosa e pouco exequível em nosso meio.

Seja de forma isolada ou pré coleta celular, em todos os estudos em que foi utilizado o G-CSF houve preocupação em demonstrar a segurança da droga. Apesar de observado aumento transitório do diâmetro do baço na maioria dos pacientes, em nenhum estudo houve rotura esplênica e a droga foi bem tolerada. [96, 99, 100, 105, 106, 108, 112, 113] Esta citocina pode ser uma ferramenta valiosa no futuro como rotina de recrutamento celular na insuficiência hepática.

Infusão de CTMO visando viabilização de hepatectomia

am Esch *et al* [95] conduziram um estudo para avaliar o efeito da infusão de células CD133+ na regeneração hepática após embolização seletiva da veia porta, a fim de permitir hepatectomia direita estendida em pacientes com tumor hepático. Os 6 pacientes foram incluídos de forma consecutiva e divididos em 2 grupos não comparáveis. Os tumores variaram entre primários (CHC, colangiocarcinoma) e metastáticos (côlon, neuroendócrino) e nenhum paciente possuía cirrose subjacente. As CTMO foram obtidas por aspiração da MO e a fração mononuclear foi

enriquecida com células CD133+ por meio automatizado. As células foram infundidas nos ramos não ocluídos da veia porta (segmentos II e III) após a embolização. Posteriormente, o ganho de volume no lobo esquerdo foi avaliado por TC através de volumetria. Houve aumento significativo do volume remanescente no grupo que recebeu a infusão celular em relação ao outro grupo, e os 3 pacientes do grupo tratado puderam ser submetidos à hepatectomia.

O protocolo foi aplicado pelo mesmos investigadores [101] com 6 pacientes no grupo tratamento portadores de hepatopatia subjacente (esteatose, fibrose ou hepatotoxicidade por quimioterapia). Sete pacientes considerados viáveis para receber tratamento convencional (apenas embolização) foram considerados controles. Novamente houve maior ganho de volume no lobo esquerdo no grupo tratamento.

3.7.6 Avaliando segurança em ensaios clínicos

Um evento adverso é definido como qualquer ocorrência desfavorável e não intencional em um sujeito que tenha recebido um produto farmacológico ou biológico. O evento pode ou não estar relacionado ao uso do produto em questão, [115] a idéia é reportar sempre, analisar depois. Por definição, um evento adverso é considerado grave quando leva ao óbito, hospitalização, incapacidade funcional ou anomalia congênita. Eventos que não se enquadrem nestes critérios podem ser considerados graves quando constituam ameaça ao paciente ou demandem intervenção clínica ou cirúrgica. [115]

Na terapia com CTMO em doenças hepáticas, eventos adversos podem ocorrer em diversas etapas dos protocolos e irão variar segundo a metodologia

utilizada. Ainda não existem na literatura tentativas de normatizar a avaliação de segurança nesta população e a heterogeneidade das metodologias empregadas certamente contribuem para isto. A avaliação de segurança já foi extensamente discutida para o procedimento de transplante de células-tronco hematopoiéticas (HSCT). [115] Como o HSCT pode ser a única alternativa de cura para doenças hematológicas malignas, é aceita uma frequência alta de eventos adversos em nome da relação risco-benefício, como a GVHD. Naturalmente, não é possível extrapolar este padrão de aceitação para a pesquisa da terapia com CTMO em doenças crônicas e a questão merece discussão mais ampla.

O grau de invasão do paciente cirrótico em cada estudo clínico merece especial atenção. Um protocolo pode envolver procedimentos como anestesia geral, arteriografia e acesso à veia porta por punção. O risco anestésico e cirúrgico do paciente com cirrose, mesmo em procedimento não-hepático, é elevado e anestesia geral pode provocar isquemia hepática relativa com repercussões clínicas. [116] A intubação orotraqueal protege contra broncoaspiração e de garante via aérea segura durante procedimento invasivo mas não é livre de complicações, como trauma de vias aéreas. Idealmente, a anestesia local deveria ser empregada em caso de aspiração da MO.

A via de infusão invasiva, como diretamente em vasos hepáticos, acrescenta risco ao protocolo clínico porém com aumento potencial do estabelecimento das células no fígado. Pode ser realizada por punção ou dissecação cirúrgica da veia porta ou cateterismo da artéria hepática. Embora a maior parte do fluxo sanguíneo no fígado saudável seja proveniente da veia porta, é notável o aumento da contribuição da artéria hepática na cirrose, tornando-a via atraente. Entretanto, a morbidade da arteriografia pode ser significativa na cirrose hepática, devido aos

distúrbios de coagulação e risco de insuficiência hepática aguda no caso de complicação vascular. Devemos ter em mente que o procedimento envolve uso de contraste iodado que, mesmo em sua forma não-iônica, oferece risco de deterioração da função renal. A manipulação por cateter pode resultar em dissecção da camada íntima secundária é reversível na maioria das vezes. Quando isto não ocorre, pode resultar em oclusão arterial ou estenose. Por este motivo, a trombose de veia porta é classicamente uma contraindicação relativa para cateterização da artéria hepática. [117] A transfusão de plasma e plaquetas pode ser necessária para a realização da arteriografia em pacientes com cirrose. Embora hoje o risco de infecção transmitida por hemoderivados tenha caído, reações transfusionais leves (exantema, febre, calafrios, broncoespasmo) e graves (anafilaxia, hemólise, injúria pulmonar) podem ocorrer. [118]

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um ensaio clínico de fase I, unicêntrico. [93]

4.2 CASUÍSTICA E CAPTAÇÃO DA AMOSTRA

Foram avaliados para inclusão pacientes com diagnóstico de cirrose e insuficiência hepática atendidos nos Ambulatórios do Serviço de Hepatologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – HUCFF/UFRJ, no período de outubro de 2005 a dezembro de 2006. Utilizamos o processo de busca ativa através da análise de prontuários deste Ambulatório e recebemos pacientes encaminhados do Ambulatório de Pesquisa em Cirrose Hepática, coordenado pelas Profs. Cristiane Vilella e Renata Perez.

O estudo foi originalmente desenhado para inclusão de 30 pacientes, que seriam divididos por randomização em grupo intervenção e grupo controle.

Critérios de inclusão

- Idade de 18 a 75 anos;
- Cirrose com insuficiência hepática crônica de qualquer etiologia com indicação de transplante hepático, ainda que fora de listagem oficial por limites de idade ou co-morbidade;

- Classificação de CP de B7 a C10 e escore MELD menor que 20;
- Abstinência do uso de álcool por, pelo menos, 1 ano;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão

- Expectativa de realização de transplante hepático com doador cadáver em menos de um ano;
- Expectativa de realização de transplante hepático intervivo;
- Coagulopatia com INR $>2,0$ ou plaquetometria <40.000 ;
- Encefalopatia hepática descompensada;
- Trombose de vasos hepáticos;
- Evidências laboratoriais ou radiológicas de CHC;
- Insuficiência cardíaca, arritmias ou doença coronariana descompensadas;

- Insuficiência renal com creatinina acima de 2 mg/dL;
- Neoplasias malignas exceto câncer de pele não-melanoma;
- Doenças hematológicas primárias;
- Dependência de suporte orgânico, como circulatório, ventilatório ou dialítico;
- Sepses;
- Anti-HIV positivo;
- Gravidez;
- Participação em outro ensaio clínico.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo obteve aprovação pelo comitê de ética em pesquisa local (CEP 109/05) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (Protocolo de Pesquisa nº 12573 – CONEP), e foi registrado no portal ClinicalTrials.gov (ID NCT00382278).

A inclusão de cada paciente no projeto foi realizada após esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos por parte dos pesquisadores (Pesquisador Responsável Prof. Guilherme Rezende e aluna de mestrado Dra. Bianca Guaraldi) e

leitura conjunta do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE), com posterior assinatura por sujeito e pesquisador. (Anexo 1).

Ao longo da execução do estudo, relatórios regulares foram enviados ao sistema CEP/CONEP e a uma Comissão Independente Multidisciplinar de pesquisadores da UFRJ. Estas comissões poderiam determinar a imediata interrupção do estudo a qualquer momento, caso julgassem necessário.

4.4 AVALIAÇÃO PRÉ INCLUSÃO

A avaliação pré inclusão consistiu em anamnese, exame físico, avaliação laboratorial preliminar, USD e TC/RM com estudo dinâmico. A avaliação preliminar consistiu em hemograma e dos seguintes exames em soro: proteínas totais e albumina, bilirrubinas, TAP, AST, ALT, FA, GGT, sódio, potássio, uréia, creatinina, AFP. Foram considerados válidos os exames laboratoriais dos últimos 30 dias e os exames de imagem dos últimos 3 meses. Foram aceitos exames realizados em outras instituições. Os objetivos foram confirmar o diagnóstico de cirrose hepática e o escore CP, detectar co-morbidades previstas nos critérios de exclusão e afastar trombose de vasos hepáticos e CHC.

Após esta avaliação inicial e assinatura do TCLE, duplas consecutivas de pacientes foram reconvocadas e submetidas a randomização, na presença de testemunhas, por método simples (lance de moeda ou sorteio). Os pacientes foram, então, alocados nos grupos intervenção ou controle.

4.5 PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO

Admissão hospitalar (D0)

Quando alocado para o grupo intervenção, o paciente foi admitido na véspera do procedimento, sendo esse considerado o D0 de protocolo. Neste dia, o paciente foi submetido a avaliação clínica, visita pré anestésica e USD de vasos hepáticos.

Em caso de uso prévio de diuréticos ou metformina, as medicações foram interrompidas no dia anterior à admissão. Foi realizada hidratação venosa com solução salina (1000 mL em infusão contínua, 12 horas antes e 12 horas após o final da intervenção) e em caso de diabetes mellitus (DM) ou elevação prévia de escórias nitrogenadas ($Cr > 1,3$ mg/dL), os pacientes receberam hidratação com solução bicarbonatada para profilaxia de nefropatia por contraste iodado.

Aspiração da medula óssea (D1)

Antes do encaminhamento ao centro cirúrgico, foram coletadas amostras de sangue para exames laboratoriais e obtenção de soro autólogo para suspensão das CMMO. Em centro cirúrgico, procedeu-se à anestesia para a aspiração de MO após avaliação do anestesista responsável, alocado pelo Serviço de Anestesiologia do HUCFF em sistema de rodízio. Na possibilidade de realização do procedimento sob anestesia local com sedação, esta foi preferida, devido ao menor risco anestésico. De acordo com o parecer do anestesiológico, poderia ser dada a preferência pela anestesia geral. Em decúbito ventral, foram realizadas assepsia e antissepsia na região de ambas as cristas ilíacas póstero-superiores e realizadas cerca de 20 aspirações (10 em cada crista ilíaca), obtendo-se um total de 100 ml de MO, conforme protocolo utilizado pelo Serviço de Hematologia do HUCFF. [119] Após

observação na Unidade de Recuperação Pós Anestésica, o paciente foi encaminhado ao quarto.

Separação de células

O material proveniente da aspiração chegou ao Laboratório de Marcação de Células e Moléculas do Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF em 20 seringas heparinizadas contendo 5 mL de aspirado de MO em cada. Após filtração de coágulos, gordura e espículas ósseas, foi iniciada a separação de células por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque 1.077 g/mL. O anel foi diluído em albumina a 5% e soro autólogo em um total de 20 mL, com contagem mínima esperada de $5 - 10 \times 10^7$ células para a infusão. Esta técnica é a mesma utilizada por nossos colaboradores na linha de pesquisa de terapia celular em cardiologia.

[63]

Da solução contendo as CMMO, foram retiradas pequenas alíquotas para:

- contagem celular;
- imunofenotipagem por citometria de fluxo em aparelho BD FACSCanto™ classe 1, realizada no Laboratório de Terapia Celular do Instituto Nacional de Cardiologia;
- culturas (germes comuns e fungos), encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do HUCFF;
- marcação celular com radioisótopo.

Marcação das CMMO com radioisótopo

Uma alíquota (10%) da solução final contendo as CMMO foi incubada com 500 µl de cloreto estano (SnCl₂) em NaCl 0,9% por 10 minutos em temperatura

ambiente, conforme técnica desenvolvida no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF/UFRJ. A seguir, as células foram incubadas por mais 10 minutos com 45 mCi de Tc99m. Após centrifugação (500 x g por 5 minutos), o sobrenadante foi removido e lavado novamente com solução salina. A viabilidade das células marcadas foi avaliada pelo teste de exclusão vital com azul Trepam. As células marcadas foram agregadas ao restante da suspensão de CMMO, sendo a solução final transferida para duas seringas de 10 mL encaminhadas à Unidade de Hemodinâmica.

Infusão da solução final por arteriografia

Aproximadamente 3 horas após aspiração da MO, o paciente foi submetido a arteriografia de tronco celíaco através de punção da artéria femoral, com técnica semelhante à de quimioembolização arterial para CHC. [117] Foi realizada reserva de plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas conforme os níveis de segurança observados na prática clínica (TAP < 50%, plaquetometria < 50.000) e a transfusão foi indicada a critério do Radiologista Intervencionista responsável.

A liberação da solução final contendo as CMMO foi realizada em injeção lenta, preferencialmente na artéria hepática própria. A injeção de contraste iodado após liberação da solução final foi evitada por risco presumido de toxicidade celular por hiperosmolaridade.

Avaliação cintilográfica (D1 e D2)

Os pacientes foram submetidos a cintilografia de corpo inteiro no Serviço de Medicina Nuclear do HUCFF 3h e 24h após o término da infusão das CMMO para avaliação do grau de retenção do radioisótopo no fígado.

Avaliação por USD e alta (D3)

Foi realizado USD de vasos hepáticos 48 horas após a infusão celular, para avaliação de parâmetros hemodinâmicos e detecção de possíveis complicações vasculares. Durante a internação, foram realizadas avaliações clínicas e exames laboratoriais diários, e o paciente, estando em condições de alta, foi liberado após 3 dias de observação.

4.6 PROTOCOLO DE SEGUIMENTO

Foi estipulado um tempo de seguimento de 12 meses, sendo utilizados parâmetros clínicos, laboratoriais, exames de imagem e avaliação da hemodinâmica hepática por USD.

Exames laboratoriais

Foi realizada coleta de sangue para exames laboratoriais diariamente durante o período da intervenção e a cada visita ambulatorial de seguimento. A quantificação desses parâmetros foi realizada no laboratório de análises clínicas do HUCFF.

Exames de imagem

Foram realizados exames seriados de USD (Quadro 2). O equipamento de ultra-sonografia utilizado foi da marca Siemens modelo G50, com sonda convexa multifrequencial de 2-5 MHz.

Foi repetida a TC de abdome superior com estudo dinâmico ao final do seguimento para avaliar surgimento de lesões focais hepáticas. Em pacientes com

história de reação alérgica a frutos do mar ou medicamentos, foi realizado preparo com corticóide e anti-histamínico conforme esquema preconizado pelo Serviço de Anestesiologia do HUCFF. Foram aceitos TC e RM realizados em outros serviços segundo julgamento dos pesquisadores. O protocolo de seguimento está detalhado no Quadro 2.

Quadro 2. Protocolo de seguimento

| Exame | Pré | D0 | D1 | D2 | D3 | D7 | D14 | D30 | D45 | D60 | D90 | D120 | D180 | D270 | D360 |
|---------------|-----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| consulta | | | | | | | | | | | | | | | |
| hemograma | | | | | | | | | | | | | | | |
| albumina | | | | | | | | | | | | | | | |
| bilirrubinas | | | | | | | | | | | | | | | |
| TAP | | | | | | | | | | | | | | | |
| pTT | | | | | | | | | | | | | | | |
| AST | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALT | | | | | | | | | | | | | | | |
| FA | | | | | | | | | | | | | | | |
| GGT | | | | | | | | | | | | | | | |
| sódio | | | | | | | | | | | | | | | |
| potássio | | | | | | | | | | | | | | | |
| uréia | | | | | | | | | | | | | | | |
| creatinina | | | | | | | | | | | | | | | |
| glicose | | | | | | | | | | | | | | | |
| AFP | | | | | | | | | | | | | | | |
| ferro | | | | | | | | | | | | | | | |
| ferritina | | | | | | | | | | | | | | | |
| TIBC | | | | | | | | | | | | | | | |
| colesterol | | | | | | | | | | | | | | | |
| triglicérides | | | | | | | | | | | | | | | |
| T4 livre | | | | | | | | | | | | | | | |
| TSH | | | | | | | | | | | | | | | |
| USD | | | | | | | | | | | | | | | |
| cintigrafia | | | | | | | | | | | | | | | |
| TC/RM | | | | | | | | | | | | | | | |

Os quadros não hachurados equivalem aos exames realizados em cada visita.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas foram apresentadas individualmente ou expressas por média, desvio-padrão e mediana, quando pertinente. Após consultas com estatísticos da instituição, devido ao reduzido número de pacientes foi realizada apenas análise descritiva. Foram construídas curvas de tendência para as variáveis numéricas ao longo do seguimento.

4.8 ANÁLISE DE EXEQUIBILIDADE E SEGURANÇA

A exequibilidade foi avaliada no contexto de um protocolo de pesquisa multidisciplinar invasivo, complexo, envolvendo seres humanos e executado com os recursos técnicos de um hospital público.

A avaliação de segurança foi realizada prospectivamente com a coleta de dados clínicos, laboratoriais e radiológicos. Os procedimentos invasivos foram sempre acompanhados por pelo menos um dos pesquisadores (aluna e/ou orientador). Os pacientes foram cuidadosamente monitorados para ocorrência de eventos adversos.

Os seguintes eventos foram considerados possíveis em cada etapa do protocolo:

- TC ou RM: náusea, vômito, exantema, angioedema, reação anafilactóide e nefropatia secundários ao contraste iodado.
- Ato anestésico: trauma de intubação orotraqueal, broncoaspiração, insuficiência respiratória aguda, instabilidade hemodinâmica, evento

cardiovascular isquêmico ou hemorrágico, arritmia cardíaca, piora da função hepática no período pós-operatório precoce.

- Aspiração de MO: dor, equimose ou hematoma nos sítios de punção; queda do hematócrito com repercussão clínica.
- Arteriografia de tronco celíaco: dor, equimose, hematoma ou infecção no sítio de punção femoral; vasoespasmos, trombose, dissecação, estenose ou aneurisma em quaisquer dos vasos manipulados; reações secundárias ao contraste iodado; instabilidade hemodinâmica; transfusão de hemoderivado.
- Infusão celular: febre, bacteremia, choque séptico.

Foram considerados eventos adversos graves: complicação vascular permanente secundária a manipulação por cateterismo; insuficiência renal aguda; choque; insuficiência hepática com indicação de transplante de urgência; elevação progressiva de AFP; nódulo hepático novo compatível com CHC e óbito.

Outros eventos não previstos foram avaliados e classificados de acordo com a morbidade.

5 RESULTADOS

5.1 REESTRUTURAÇÃO DO DESENHO

Após a inclusão da quinta dupla de pacientes, a randomização foi interrompida, com inclusão consecutiva de pacientes apenas no grupo intervenção. Pouco depois, decidimos reduzir o grupo intervenção de 15 para 8 pacientes, interrompendo a inclusão em dezembro de 2006.

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA

5.2.1 Características gerais da amostra

No período entre outubro de 2005 e dezembro de 2006, foram incluídos 13 pacientes, dos quais 5 foram selecionados inicialmente como pacientes controle através de randomização. Um paciente controle foi excluído precocemente devido a início, pelo médico assistente, de tratamento específico (imunossupressão para hepatite auto-imune). Ao longo do estudo, devido a não aderência ao protocolo de seguimento, 2 pacientes controle foram excluídos. Em um destes, a progressão de síndrome hepatopulmonar contribuiu para a não-aderência. Um paciente controle foi diagnosticado com CHC multicêntrico pelo seu médico e também excluído. Houve 1 exclusão de paciente controle por óbito, em consequência de PBE e posterior SHR.

A amostra constituiu-se, portanto, de 8 pacientes no grupo intervenção, sendo 5 do sexo masculino, com média de idade de $57,6 \pm 7,8$ anos (variação: 49-68 anos). Quanto à etiologia, 5 pacientes apresentavam infecção pelo VHC, um paciente

DHGNA e dois pacientes cirrose alcoólica. Dois pacientes possuíam, além da infecção pelo VHC, história de abuso de álcool.

No início do estudo, a média da classificação de Child foi de $8,13 \pm 0,99$ (variação: 7 a 10) e a média na escala MELD de $12,75 \pm 1,67$ (variação: 11 a 16). Cinco pacientes apresentavam ascite compensada com diuréticos e 2 pacientes faziam uso de lactulose, apresentando-se sem EH no momento da inclusão. As características individuais dos pacientes estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Características da amostra.

| P | Sexo | Idade | Etiologia | Ascite | EH |
|---|------|-------|-----------|--------|----|
| 1 | F | 67 | DHGNA | S | N |
| 2 | M | 55 | OH | N | N |
| 3 | F | 51 | VHC | S | N |
| 4 | M | 55 | VHC/OH | S | N |
| 5 | M | 68 | VHC | S | S |
| 6 | M | 51 | VHC | N | N |
| 7 | F | 49 | VHC/OH | S | S |
| 8 | M | 65 | OH | N | N |

5.2.2 Celularidade do material infundido

A média do total de células infundidas foi de $6,68 \pm 4,9 \times 10^8$ (variação: 2 a 15×10^8); com percentuais médios de MSC de $1,02 \pm 0,62\%$ e de HSC, $1,26 \pm 0,65\%$. A viabilidade do material infundido variou entre 94 e 98%, salvo em uma amostra em que foi igual a 42%.

Não houve correlação entre as contagens celulares total e diferencial com idade, gravidade da doença e infecção pelo VHC. As características individuais do material infundido estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Celularidade do material infundido.

| <i>Pacientes</i> | Infundidas ($\times 10^8$) | CMMO (%) | MSC (%) | HSC (%) |
|------------------|------------------------------|----------|---------|---------|
| 1 | 12,03 | 71,87 | 1,44 | 1,16 |
| 2 | 2,5 | 73,97 | 1,38 | 1,04 |
| 3 | 2,5 | 59 | 0,09 | 2,27 |
| 4 | 15 | 78 | 1,55 | 0,66 |
| 5 | 8,44 | 79 | 1,44 | 0,43 |
| 6 | 7,48 | 74 | 0,93 | 2,15 |
| 7 | 2 | 72,87 | 1,3 | 1,15 |
| 8 | 3,5 | 21,16 | 0,02 | 1,21 |

CMMO, células mononucleares de medula óssea; MSC, células-tronco estromais mesenquimais; HSC, células-tronco hematopoiéticas.

5.2.3 Cinética celular

Foram realizadas cintigrafias de corpo inteiro 3 horas após a infusão celular em 7 pacientes. A média de retenção do radioisótopo no fígado foi de 52,53% (variação: 31,6 – 59,9%). Em 5 pacientes foi possível avaliar a relação da captação entre fígado e baço, que foi em média 5,63 (variação: 2,23 – 9,9).

Foi possível repetir o exame 24 horas após a infusão celular em 3 pacientes, com queda da captação média no fígado para 26% (variação: 20,11 – 31,84).

5.2.4 Evolução individual

Paciente 1

DCT, feminina, 67 anos; cirrose hepática por DHGNA, hipotireoidismo, obesidade e DM2 controlado com euglicemiantes orais. Possuía CP B8, escore MELD 11, ascite controlada com dose baixa de diurético, sem história de EH. Foi submetida a aspiração de MO sob anestesia local com sedação, sem eventos adversos além de dor local. Não necessitou de hemoderivados pré ou pós arteriografia. Durante o seguimento, não foram observados eventos clínicos.

Apresentou, 6 meses após o final do seguimento, trombose de veia porta, ascite volumosa, HDA e EH persistente, com internações sucessivas. O último registro no prontuário foi efetuado há mais de 1 ano, o que sugere óbito fora da instituição.

Paciente 2

JCB, masculino, 55 anos; cirrose alcoólica, hipertensão arterial sistêmica (HAS) controlada, erisipela de repetição e abstinência de álcool relatada por mais de 1 ano antes da inclusão. Apresentava anticorpo anti-VHC positivo com exames PCR-RNA VHC negativos em duas ocasiões.

Possuía CP B8, escore MELD 13, sem história de complicações da cirrose. Foi submetido a aspiração de MO sob anestesia local com sedação, sem eventos adversos além de dor local. Não necessitou de hemoderivados pré ou pós arteriografia. Houve dificuldade técnica na cateterização da artéria hepática própria e

foi optado por injeção do material no ramo esquerdo da artéria hepática que, por variação anatômica, originava-se diretamente do tronco celíaco.

No 5º mês de seguimento, o paciente procurou o ambulatório de pesquisa com quadro de erisipela bolhosa em membro inferior esquerdo iniciado poucos dias antes. Em condição estável, recebeu prescrição de antibiótico oral (amoxicilina + sulbactam) por 10 dias. Após melhora clínica completa, interrompeu o tratamento no 7º dia por conta própria, devido a intolerância gastrointestinal. Foi mantida a recomendação de profilaxia com penicilina benzatina.

Após 40 dias, o paciente apresentou novo episódio de erisipela no mesmo membro, sendo admitido no HUCFF para antibioticoterapia venosa (cefazolina). Recebeu alta após 8 dias.

Em consulta ambulatorial de rotina referente ao D270, o paciente referiu aparecimento de nódulos subcutâneos em membros superiores, nos sítios de punção venosa da internação recente. Foi indicado tratamento com calor local, considerada a hipótese de tromboflebite.

Por volta do 10º mês, o paciente foi admitido no Serviço de Emergência do HUCFF em estado hiperosmolar não-cetótico, permanecendo na Enfermaria de Endocrinologia para insulino-terapia venosa. Durante a internação evoluiu com melhora espontânea das lesões em membros superiores e recebeu alta após 7 dias com orientação dietética e prescrição de insulina subcutânea diária.

Cinco semanas após a segunda alta hospitalar, o paciente apresentou recorrência das lesões subcutâneas, porém em maior número e com sinais flogísticos (dor, edema, eritema e calor local). Foi encaminhado para o Ambulatório de Dermatologia e recebeu o diagnóstico histológico de fasciíte eosinofílica. Dez semanas após o final do seguimento, foi iniciada corticoterapia oral com controle

sintomático das lesões, apresentando importante elevação das glicemias. Foi iniciada terapia imunossupressora com azatioprina visando manutenção de remissão e desmame do corticóide, o que ocorreu após 2 meses. Completado o total de 6 meses de uso de azatioprina, esta foi suspensa. O paciente encontra-se assintomático e com glicemias controladas.

Mantido o acompanhamento no Ambulatório de Hepatologia, foi observada elevação evolutiva discreta das transaminases sem causa aparente. Devido ao uso recente de imunossupressor, foi solicitado novo PCR-VHC (terceira amostra), para afastar infecção oculta pelo VHC. O teste qualitativo foi positivo, e o quantitativo mostrou baixa carga viral. Há, neste momento, sinais de progressão da hipertensão portal, com novas infecções cutâneas.

Paciente 3

MST, feminina, 51 anos, cirrose hepática por VHC; hipotireoidismo e tabagismo. Alergia a frutos do mar com edema de laringe prévio motivou o preparo obrigatório com corticosteróides para procedimentos envolvendo contraste iodado (TCs e arteriografia para infusão de CMMO).

Possuía CP B8, score MELD 12, ascite controlada com diurético. Submetida a aspiração de MO sob anestesia local sem intercorrências e não necessitou de hemoderivados para realização da arteriografia. Durante o cateterismo, houve dissecação da camada íntima da artéria hepática própria com trombose transitória. Foram injetados nitrato e anticoagulante com boa resposta e foi efetuado recuo do cateter até o tronco celíaco, onde foi realizada a infusão celular. USD em D3

demonstrou recanalização completa do vaso, não havendo prejuízo da função hepática.

Apresentou em exames de D180 teste de tolerância com glicose anidra diagnóstico de DM2. Passou a ser medicada com lactulose para EH subclínica. Níveis de TSH elevaram-se acentuadamente no D360 de seguimento, sendo ajustada dose de levotiroxina. No décimo mês após o final do seguimento, houve elevação de AFP e RM de abdome superior revelou lesão de 1,1 cm compatível com CHC. Foi submetida a uma sessão de quimioembolização porém evoluiu com piora lenta e progressiva da função hepática. USD sete meses após o diagnóstico de CHC revelou múltiplas lesões compatíveis com CHC multicêntrico e trombose parcial de veia porta. No mês seguinte, foi a óbito por sepse.

Paciente 4

VCF, masculino, 55 anos; cirrose por VHC, história de HAS. Possuía CP C10, escore MELD 16, ascite compensada com diurético e um episódio prévio isolado de EH.

Por opção do anestesista responsável, foi realizada a aspiração de MO sob anestesia geral. O paciente evoluiu com laringoespasma imediatamente após a extubação, revertido após ventilação com máscara e ambu e corticóide venoso. Foi monitorizado e observado em setor de recuperação pós anestésica. Manteve-se estável e lúcido e consentiu com a progressão do protocolo.

Recebeu plasma fresco pré arteriografia, que foi realizada sem intercorrências. Seis horas após, apresentou hipotensão arterial, alteração de repolarização em paredes anterior e lateral alta ao eletrocardiograma e elevação de

CK e CKMB, sem qualquer sintoma. Realizada TC de abdome que não mostrou hematomas. O paciente foi encaminhado para a Unidade Coronariana do HUCFF. O ecocardiograma transtorácico de admissão mostrou disfunção sistólica leve do ventrículo esquerdo com hipocinesia ântero-septo-apical. A curva enzimática para marcadores de necrose miocárdica foi positiva. Sob tratamento clínico, evoluiu com melhora da pressão arterial e do padrão eletrocardiográfico. Quatro dias depois, em novo ecocardiograma, os sinais de disfunção miocárdica haviam desaparecido. Foi submetido a cineangiocoronariografia, que não mostrou lesão coronariana obstrutiva, além de evidenciar função sistólica global preservada. A hipótese diagnóstica principal foi de síndrome de Tako-tsubo. O paciente recebeu alta hospitalar assintomático com acompanhamento pela Cardiologia. Durante a internação na Unidade Coronariana, apresentou piora de função hepática e ascite descompensada, que regrediram rapidamente ao estado basal ambulatorialmente.

Após este evento, o paciente manteve função hepática estável até a consulta D270, quando apresentou piora da ascite e dos parâmetros laboratoriais. Após o final do seguimento, apresentou PBE com sinais de choque e evoluiu para SHR. Aguardou por um enxerto hepático em hemodiálise e EH grave, até o óbito por sepse secundária a cateter venoso profundo.

Paciente 5

APS, masculino, 68 anos; cirrose hepática por VHC e álcool, doença ulcerosa péptica, HAS, tabagismo, com história de ressecção de múltiplos carcinomas basocelulares. Possuía CP B9, escore MELD 14, ascite e EH compensadas.

Foi submetido a aspiração de MO sob anestesia local com sedação, não tendo apresentado nenhum evento adverso além de dor local. Recebeu transfusão de plasma fresco pré arteriografia.

Apresentou a partir de D180 piora de CP. Em não sendo identificados fatores desencadeantes, foi atribuída a progressão da doença. Manteve estabilidade em CP C12 até o final do seguimento. Apresentou PBE após 6 meses com óbito na instituição.

Paciente 6

CAS, masculino, 51 anos; cirrose por VHC, história de HAS. Possuía CP B7, escore MELD 12. Apresentava história de HDA varicosa (3 episódios), em regime de profilaxia secundária, com episódios de ascite relacionados a sangramento. Não havia ascite no momento da inclusão e nem uso de diurético.

Foi submetido a aspiração de MO sob anestesia local com sedação, não tendo apresentado nenhum evento adverso além de dor local. Recebeu transfusão de plasma fresco pré arteriografia.

Na 7ª semana pós infusão, foi encaminhado para internação com diagnóstico de celulite de membro inferior direito. Foi iniciado tratamento com antibiótico específico venoso (oxacilina) e afastada artrite séptica. As hemoculturas foram negativas. Apresentou, no período de internação, ascite e piora de função hepática. Permaneceu internado por 20 dias e complementou o tratamento com antibiótico oral após alta hospitalar. Houve regressão espontânea da ascite e retorno dos indicadores de função hepática aos níveis de base. Manteve-se em situação clínica estável.

TC e USD correspondentes ao D360 de seguimento evidenciaram nódulo de 3,0 cm na projeção do segmento VI do fígado, com critérios diagnósticos para CHC. Não havia elevação da AFP sérica. No seguimento pós final de protocolo, foram realizadas 3 sessões de quimioembolização hepática, com progressão da doença a CHC multicêntrico fora de critérios para transplante hepático e óbito.

Paciente 7

EMC, feminina, 49 anos; cirrose por VCH e álcool. Possuía CP B8 e escore MELD 13. Apresentava história de HDA varicosa (8 episódios), em regime de profilaxia secundária, mais ascite e EH compensadas.

Realizou TC de triagem em clínica de radiologia privada, sem ônus, cujo laudo não descreveu lesão hepática focal. Foi submetida a aspiração de MO sob anestesia local com sedação. Durante a arteriografia, ocorreu vasoespasmó da artéria hepática revertido com injeção local de nitrato. A paciente recebeu transfusão de plasma devido a formação de hematoma no local da punção, após retirada da bainha. Após alta, houve boa evolução clínica.

Ao USD de D14 foi visualizada lesão nodular de 2,8 cm em segmento II, com fluxo arterial de baixa resistência e altamente sugestiva de CHC. Após revisão do filme da TC pré inclusão, foi confirmada a presença do nódulo hepático compatível com CHC.

A paciente foi então excluída do protocolo e encaminhada ao Programa de Transplante Hepático do HUCFF. Foi submetida à cirurgia 3 meses após, recebendo um enxerto de lobo direito (doador cadáver). Faleceu ao 6º dia do pós operatório por

complicações secundárias a disfunção precoce de enxerto. O laudo do explante evidenciou “carcinomas hepatocelulares em lobo esquerdo de 2,3 cm e 1,5 cm”.

Paciente 8

IAR, masculino, 65 anos; cirrose hepática por abuso de álcool, história de DM2, ansiedade e depressão. Possuía CP B8 e escore MELD 11, sem passado de complicações da cirrose.

Foi submetido a aspiração de MO sob anestesia geral por opção do anestesista responsável. Não foi necessária transfusão de hemoderivados pré arteriografia. Não apresentou nenhum evento adverso precoce além de dor no local da aspiração.

Após dois meses de seguimento, o paciente foi admitido no Serviço de Emergência do HUCFF com episódio de HDA. Os exames endoscópicos realizados previamente à inclusão no estudo já mostravam varizes de esôfago e esofagogástricas, além de gastropatia hipertensiva portal. Foi submetido a endoscopia digestiva alta de urgência que evidenciou sinais de sangramento recente em varizes de esôfago e de fundo gástrico. O tratamento com agente escleroterápico (Ethamolin®) foi realizado e foi necessária transfusão de concentrado de hemácias e plasma fresco. Em decorrência do sangramento, o paciente desenvolveu ascite, insuficiência renal aguda e PBE tratada com ceftriaxone. Durante a internação, foi iniciado tratamento endoscópico como profilaxia secundária cianoacrilato (Histoacryl®) e ligadura de varizes de esôfago. Recebeu alta após 16 dias, ainda com ascite, mas sem desenvolver encefalopatia.

A despeito de profilaxia secundária endoscópica e medicamentosa, o paciente apresentou novo episódio de hemorragia digestiva alta por varizes esofagogástricas, seis semanas após o primeiro, sendo este controlado com tratamento endoscópico e prescindindo de internação prolongada. Foi readmitido na Enfermaria após 3 semanas para realização de colonoscopia, por queixa persistente de hematoquesia. Não apresentou sangramento durante a internação. O exame revelou “discreta doença diverticular do cólon sigmóide e pólipos de aspecto inflamatório”, sem sinais de sangramento ativo ou recente.

Após o final do seguimento, evoluiu com piora do hiperesplenismo, com plaquetopenia importante e mesmo neutropenia durante tratamento de pneumonia. Euglicemiantes orais foram substituídos por insulina subcutânea. Apresenta EH compensada e ascite de difícil controle devido a elevação de escórias nitrogenadas.

5.2.5 Parâmetros laboratoriais

Hemoglobina e plaquetas

Houve redução do nível de hemoglobina em todos os pacientes na primeira semana após a intervenção. A queda média chegou a 11,3%, com recuperação ao D14 e estabilidade até o final do seguimento. (Figura 4)

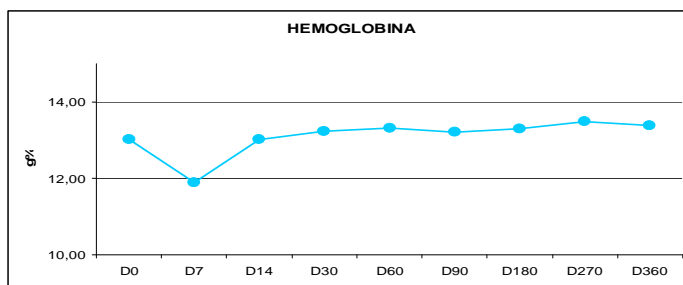


Figura 4. Média dos valores de hemoglobina.

A média das contagens de plaquetas apresentou variações ao longo do seguimento. Os pacientes 2, 4 e 5 apresentaram queda da plaquetometria abaixo de 50.000 ao D3. (Figura 5)

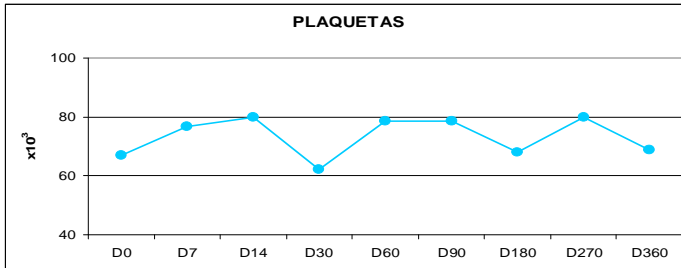


Figura 5. Média das contagens de plaquetas.

Aminotransferases

A média dos níveis de AST variou entre 72 e 106 UI/L (referência no HUCFF: 15-37 UI/L). No tocante à ALT, a variação também foi pequena, de 58 a 96 UI/L (referência: 30-65 UI/L). (Figuras 6 e 7)

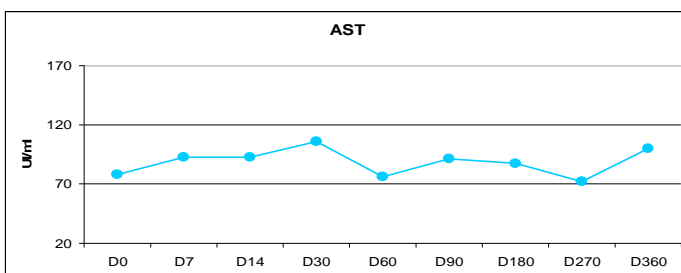


Figura 6. Média dos valores de AST.

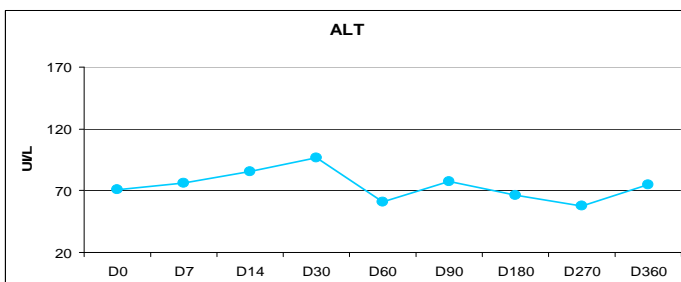


Figura 7. Média dos valores de ALT.

Albumina

A média dos níveis de albumina apresentou elevação de 7,67% em D30 em relação ao basal. O valor de final de seguimento foi superior àquele pré intervenção.

A queda acentuada entre D60 e D90 foi secundária a descompensação clínica dos pacientes 6 e 8, respectivamente por celulite grave e HDA.

Pacientes 5, 6 e 7 apresentaram elevações não sustentadas da albumina durante o seguimento. Os pacientes 1, 3 e 8 chegaram ao fim do acompanhamento com níveis maiores que os basais. O paciente 2 apresentou elevação progressiva até D360. (Figuras 8 e 9)

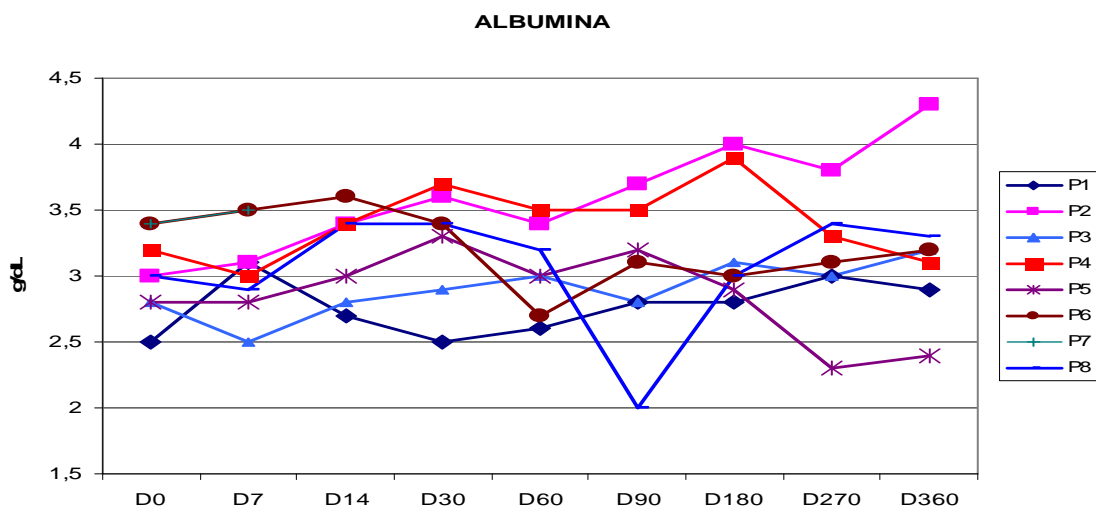


Figura 8. Valores de albumina sérica por paciente.

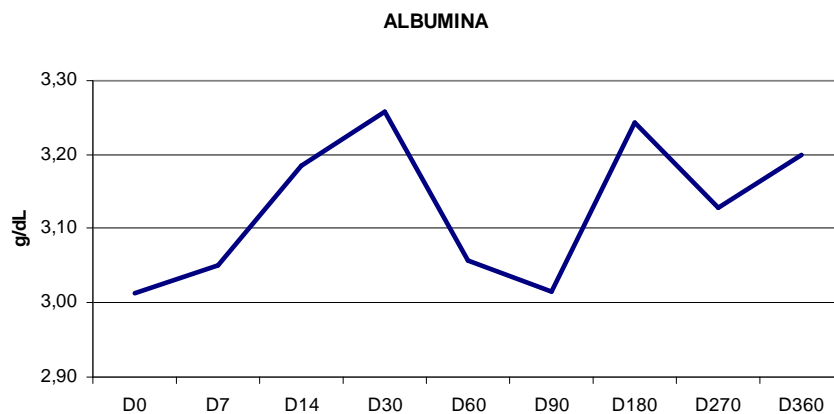


Figura 9. Média dos valores de albumina.

Bilirrubina total

A média dos níveis de BT apresentou queda de 21,13% em D7 que sustentou-se até o D90. A partir daí, tornou a elevar-se, atingiu platô em D180 e permaneceu estável até D360. (Figuras 10 e 11)

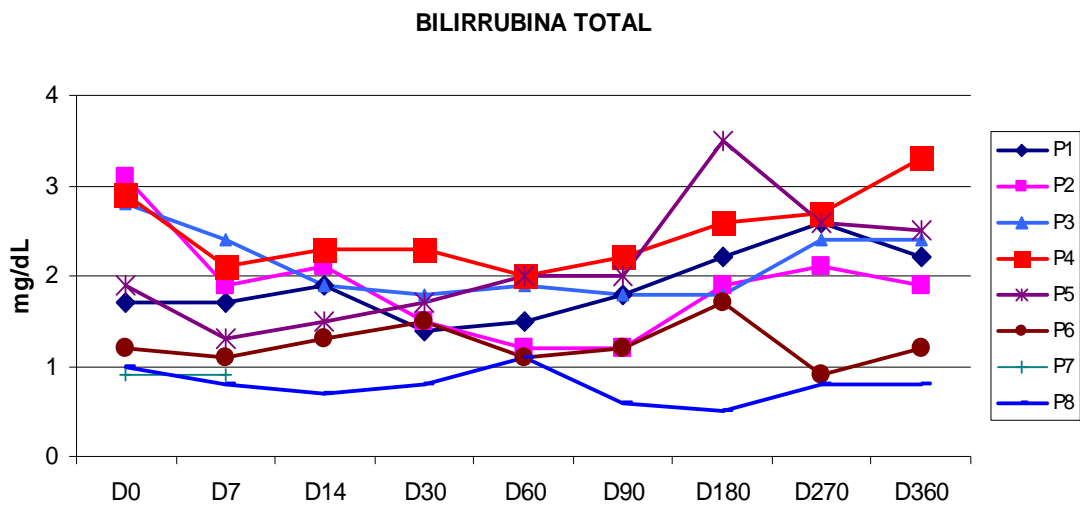


Figura 10. Valores de bilirrubina total por paciente.

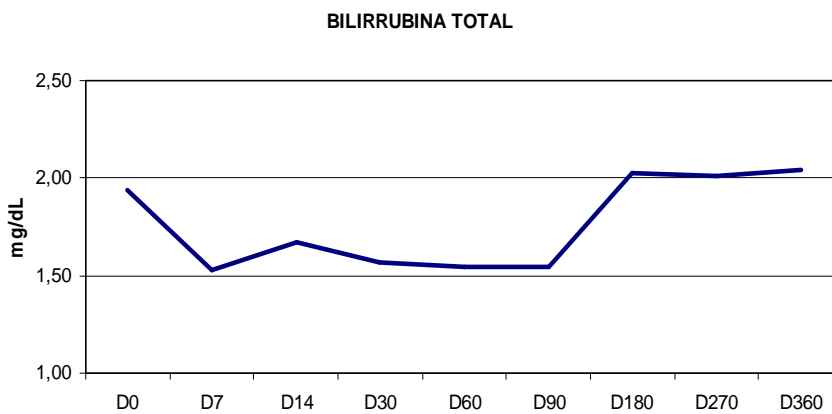


Figura 11. Média dos valores de bilirrubina total.

INR

O média do INR apresentou queda de apenas 4,58% do D0 ao D30. Houve tendência à elevação a partir do D90 e ao final do seguimento superou o valor de base. (Figuras 12 e 13)

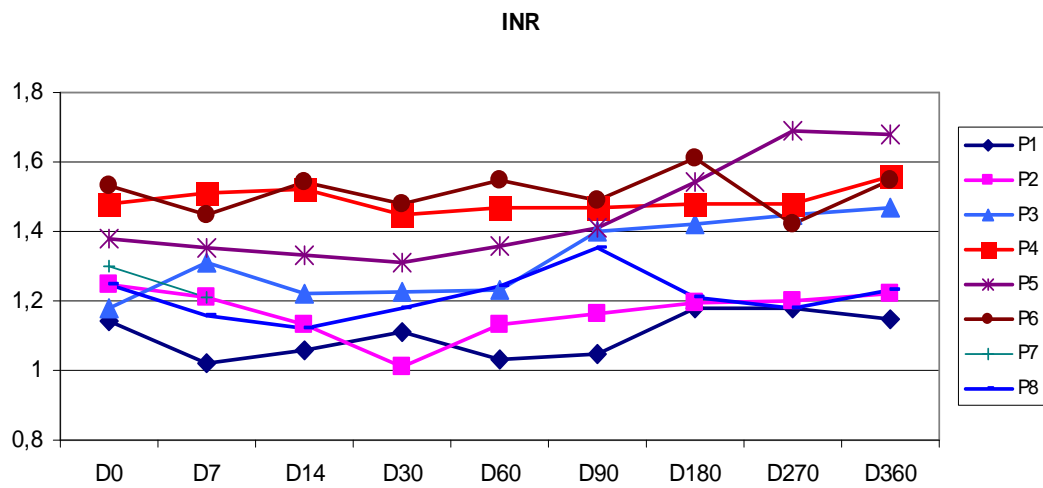


Figura 12. Valores de INR por paciente.

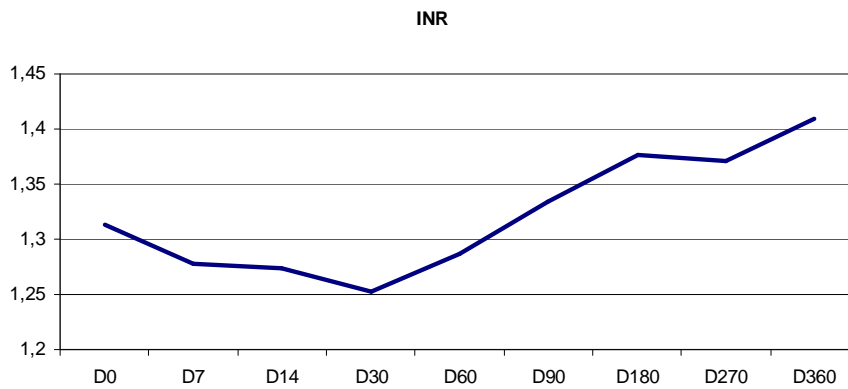


Figura 13. Média dos valores de INR.

5.2.6 Escore de Child-Pugh

Houve queda mínima na média do escore de Child-Pugh. O valor mais baixo foi verificado em D30 e foi equivalente a redução de 8,6% em relação ao valor de base. Posteriormente, houve elevação discreta porém progressiva, com valor final superior ao de base. (Fig. 14 e 15)

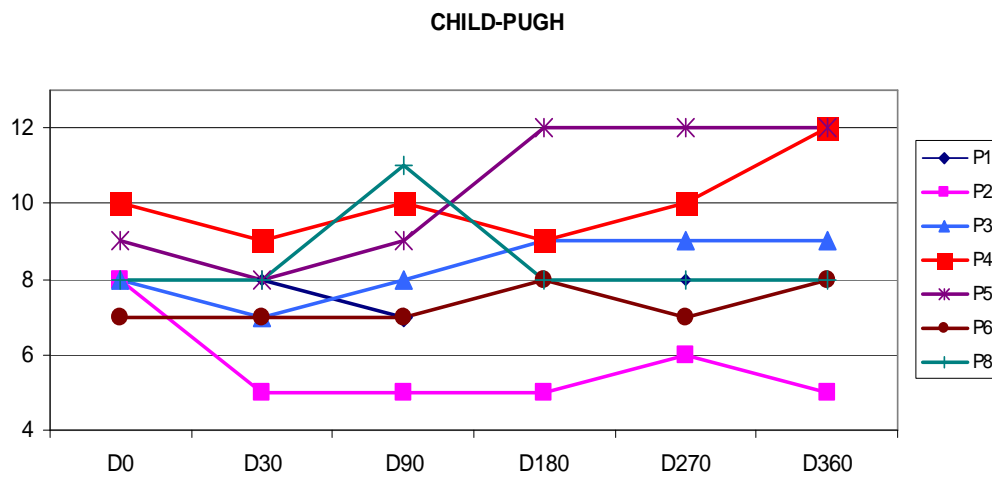


Figura 14. Escore de Child-Pugh por paciente.

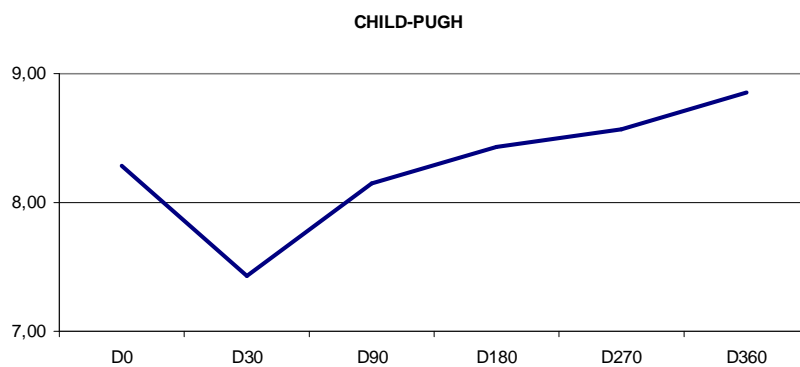


Figura 15. Média do escore de Child-Pugh.

5.2.7 Escore MELD

O valor médio do escore MELD acompanhou a tendência da pontuação de Child-Pugh. Observou-se queda de 9,2% em D30 com posterior elevação progressiva e nível superior ao de base ao final do seguimento. (Fig. 16 e 17)

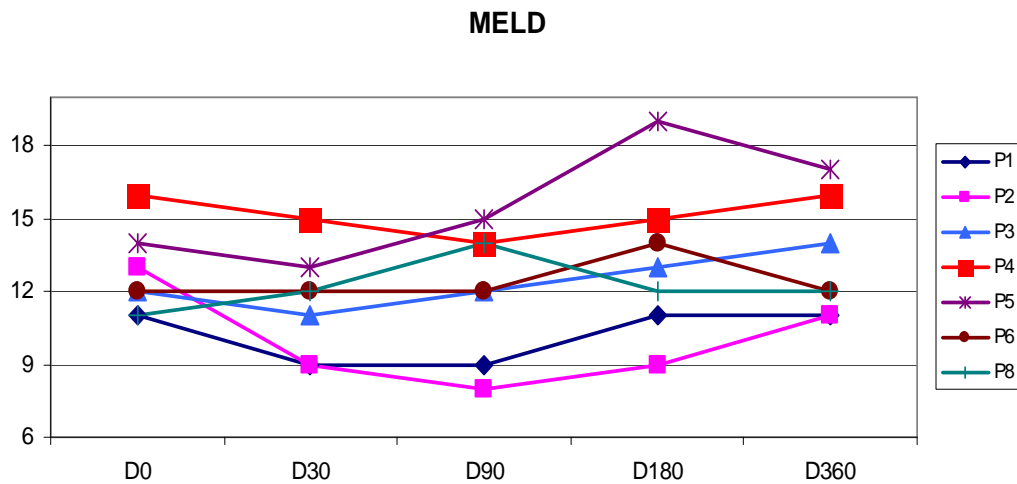


Figura 16. Escore MELD por paciente.

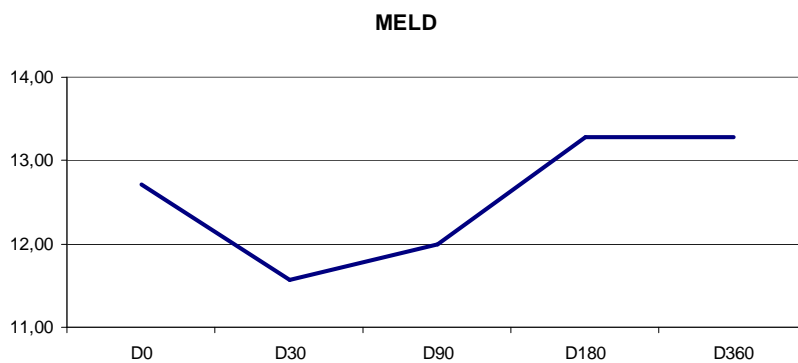


Figura 17. Média do escore MELD.

5.2.8 Parâmetros ultrassonográficos

À avaliação com *color* Dopplerfluxometria, foi observado aumento do fluxo com diminuição da resistência na artéria hepática em 6 pacientes. A análise dos parâmetros ultrassonográficos foi objeto de pesquisa de dissertação de Alessandra Lanes dos Anjos Alves, que defenderá seu trabalho em paralelo.

5.2.9 Exequibilidade e segurança

Este estudo foi concebido como um ensaio clínico randomizado de fase I. O mascaramento dos sujeitos foi julgado inexecutável devido à existência de intervenção invasiva. [93] A randomização com inclusão no grupo controle foi interrompida após a quinta dupla de pacientes. Apesar de frisarmos, durante o processo de seleção, que ainda não existia qualquer evidência de benefício da intervenção, observou-se desde o momento da randomização o desinteresse dos pacientes no grupo controle em seguir o protocolo. Isto acarretou abstenção de consultas e exames e culminou diretamente em abandono de seguimento em 2 dos 5 pacientes no grupo controle. Os pacientes passaram, então, a ser incluídos no grupo intervenção de forma consecutiva. A criação de um grupo controle através de randomização não se provou executável em nosso contexto.

Envolvemos neste trabalho profissionais dos mais diversos departamentos e unidades da UFRJ e do HUCFF, pesquisadores ou não, alguns destes situados fisicamente fora do hospital base. Coordenar estas equipes lançando mão da logística e dos recursos técnicos disponíveis em um hospital público foi um desafio. Enfrentamos problemas como falta de insumos e mau funcionamento de aparelhos e

sentimo-nos motivados a buscar recursos fora da instituição. O estabelecimento de parcerias foi importante para o andamento da pesquisa, porém a falta de coesão gerou um problema. O paciente 7 realizou a TC pré inclusão em instituição privada, devido a avaria do aparelho no HUCFF. Um nódulo de 3 centímetros compatível com CHC não foi registrado no laudo do exame e os pesquisadores não tiveram acesso imediato aos filmes. Assim, a paciente sofreu um erro de inclusão.

Todos os pacientes apresentaram dor e equimose nos sítios de aspiração da MO. Não houve manifestação clínica da queda de hematócrito. Nossa proposta inicial foi evitar a anestesia geral, no entanto, a anestesia local com sedação não foi capaz de garantir analgesia eficaz a nenhum paciente. A técnica de coleta de MO exige uma punção a cada 5 mL de MO para evitar contaminação por sangue proveniente de hematoma local. Para um volume final de 100 mL, foram realizadas no mínimo 20 punções em cada paciente, 10 em cada crista ilíaca. Cada punção provoca dor muito intensa, principalmente no momento da aspiração. Isto acarretou múltiplas pausas ao longo do procedimento para ajuste de drogas, prolongando o tempo cirúrgico de forma significativa e causando sofrimento evitável ao paciente. Mais ainda, durante todo o procedimento o paciente permaneceu em decúbito ventral, sem via aérea segura, recebendo doses crescentes de sedação. Devemos lembrar que a metabolização de drogas pode ser alentecida pela insuficiência hepática crônica e, no caso de hipoventilação, o paciente teria que ser colocado rapidamente em decúbito dorsal para intubação de urgência, muito mais arriscada.

Quando utilizamos a anestesia geral, a exposição ao anestésico foi curta pois o procedimento foi mais rápido (menos de 30 minutos). O desenvolvimento de ascite nos pacientes que faziam uso prévio de diuréticos pode ser atribuída à sua suspensão e à hidratação venosa profilática e não a hipoperfusão hepática pelo ato

anestésico. Não houve piora laboratorial da função hepática ou EH após a aspiração salvo no paciente 4. Uma complicação relacionada à intubação orotraqueal foi seguida por cardiomiopatia reversível (síndrome de Tako-tsubo). Não havia história de alergia ao látex. A internação precisou ser prolongada para permitir monitoramento em Unidade Coronariana e realização de cineangiocoronariografia.

Em relação à arteriografia de tronco celíaco, não houve eventos relacionados à administração do contraste mesmo no paciente 3, que possuía história de edema de laringe por ingestão de frutos do mar. Não foram observados níveis de creatinina acima de 0,5 mg/dL dos valores de base. Devido a plaquetometria < 50.000 e/ou TAP < 50% no dia da arteriografia, hemoderivados reservados foram transfundidos em 4 dos 8 pacientes. Foram registrados 2 eventos adversos relacionados ao cateterismo da artéria hepática comum. O paciente 2 apresentou dissecação transitória, com vaso patente ao final do procedimento e com fluxo normal ao USD menos de 24h após. A paciente 7 apresentou vasoespasm transitório e foi a única a apresentar hematoma no sítio de punção femoral, que cedeu ao prolongamento da compressão local.

6 DISCUSSÃO

A heterogeneidade da metodologia nos estudos clínicos com CTMO em cirrose compromete de forma seminal a comparação entre seus resultados. Procuramos valorizar os dados mais relevantes em relação ao nosso estudo.

A criação de grupo controle por randomização não foi exequível em nosso caso e notamos que apenas 2 outros estudos adotaram esta medida com sucesso. [100, 106] A randomização será mandatória quando conduzirmos estudos de fase II, tanto para possibilitar avaliação de eficácia quanto para distinguirmos eventos adversos de evolução natural da doença.

Durante o período de inclusão, Terai *et al* demonstraram segurança e sinais de melhora da função hepática em um protocolo utilizando como via de infusão celular a veia periférica. [98] Decidimos interromper a inclusão de pacientes em dezembro de 2006, com o objetivo de realizar estudo posterior com protocolo menos invasivo (em andamento). Considerando tratar-se de estudo de fase I, julgamos que estas decisões não prejudicaram o objetivo principal do estudo. Observamos que outros estudos de fase I, não controlados, também incluíram número pequeno de pacientes (n = 2 – 12). [96, 98, 99, 103-105, 107, 109, 110, 113]

As etiologias da cirrose hepática mais frequentes nos estudos clínicos (Tabela 1) foram, em ordem decrescente de frequência, hepatopatia alcoólica, infecção pelo VHB, infecção pelo VHC, cirrose criptogênica, doenças colestáticas e hepatite auto-imune. Incluímos apenas 1 paciente com cirrose pelo VHB devido à escassez desta etiologia em nosso meio. O paciente foi alocado em grupo controle por randomização e desenvolveu CHC durante o seguimento. Consideramos nossa amostra representativa de nossa população. Em relação à idade, nossa amostra foi

compatível com o restante dos estudos. Não incluímos pacientes com cirrose descompensada, ao contrário de outros estudos, e quando foram relatados classificação de CP e MELD, estes tenderam a ser mais elevados que em nosso grupo. Cinco estudos optaram por incluir apenas pacientes não candidatos ao transplante hepático. Caso adotássemos este critério, reduziríamos a aplicabilidade da terapia em nosso meio, onde um método útil para prolongar sobrevida em lista de transplante seria bem-vindo.

Em nosso protocolo, a manipulação do aspirado de MO fica restrita à separação da fração de CMMO e marcação com radioisótopo. Os procedimentos de aspiração e infusão das células ocorrem no mesmo dia, com aproximadamente 6 horas de intervalo. Tais características contribuem para a exequibilidade, viabilizam a reprodutibilidade do protocolo em outros centros e reduzem o custo total do procedimento. Em contrapartida, o uso de frações celulares específicas como as MSC ou mesmo as HSC em quantidades maiores só é possível através de expansão em cultura. [107, 109] Todavia, este procedimento envolve metodologia prolongada e complexa, encarecendo o procedimento celular e podendo aumentar a chance de contaminação do material.

Ao contrário de nosso estudo, em nenhum estudo clínico que elegeu a anestesia geral houve complicações que pudessem ser diretamente relacionadas ao método. [98, 113] Cabe lembrar que quando as células são mobilizadas com G-CSF e a coleta de CT é feita sob aférese, e não por aspiração da crista ilíaca, a anestesia geral não é necessária. A cardiomiopatia apresentada pelo paciente 4 tem provável relação com a complicação do ato anestésico. Foi realizado diagnóstico presuntivo de síndrome de Tako-Tsubo. Embora a fisiopatologia desta entidade continue desconhecida, o atordoamento do miocárdio mediado por catecolaminas é a

explicação mais aceita. O tratamento consiste em suporte clínico e quase todos os pacientes recuperam-se rapidamente. A síndrome foi descrita em 1990 na população japonesa e recebeu seu nome devido à armadilha para polvos (tako-tsubo), de base larga e boca estreita, semelhante ao aspecto típico do ventrículo esquerdo à ventriculografia. Este aspecto não foi visualizado em nosso paciente, porém a coronariografia foi realizada após o quarto dia, quando não havia mais disfunção miocárdica identificável ao ecocardiograma. Não podemos esquecer que as cirurgias não-cardíacas são fatores desencadeantes frequentes de eventos cardiovasculares e a recuperação pós anestesia geral é descrita como causa da síndrome de Tako-Tsubo. [120] O beta-bloqueio a que o paciente encontrava-se submetido como profilaxia primária para HDA varicosa não foi capaz de evitar o evento.

Quando este estudo foi desenhado, optamos pela infusão celular por arteriografia. Dispomos de centro de hemodinâmica equipado e com profissionais experientes na execução do procedimento, com baixa taxa de complicações. Não havia, então, estudos demonstrando resultados positivos após infusão das CTMO em veia periférica. Em nenhum estudo que tenha utilizado os vasos hepáticos para infusão de CTMO houve relato de eventos adversos vasculares, e felizmente em nossos casos os eventos foram reversíveis e não resultaram em morbidade para os pacientes. A vantagem do uso da veia periférica é a possibilidade de, no futuro, realizarmos o procedimento em caráter ambulatorial ou de hospital-dia, pois os relatos agora existentes são favoráveis. [98, 99, 107] Não observamos insuficiência renal relacionada à administração de contraste na arteriografia. No entanto, Mohamadnejad *et al* interromperam seu primeiro estudo após o óbito de 1 paciente 2 semanas após o procedimento. Consideramos que o paciente já possuía risco alto

de insuficiência renal e SHR, e talvez a inclusão em desenho de estudo envolvendo exame contrastado não tenha sido apropriada.

Quanto ao risco transfusional, não houve eventos adversos relatados neste ou em outros estudos, porém a necessidade de transfusão é uma etapa que poderia ser eliminada.

Julgamos que o G-CSF possa ser valioso para aumentar a mobilização de CTMO em pacientes com cirrose hepática, já que agora existem dados mais consistentes quanto à segurança do uso em pacientes com hipertensão portal. A insuficiência medular secundária à cirrose poderia ser compensada e contagens celulares maiores podem equivaler a procedimentos de coleta menos invasivos, quiçá mais frequentes.

Três grupos optaram, como o nosso, pela coleta de CTMO diretamente por aspiração da MO e sem o uso de G-CSF. [98, 103, 104, 107] Mohamadnejad *et al* desenvolveram dois protocolos, possivelmente para posterior comparação. O primeiro [104] utilizou células CD34+ com infusão na artéria hepática. Um óbito, já discutido, interrompeu a inclusão. Em um segundo estudo [107] MSCs da MO foram separadas, expandidas em cultura e infundidas em veia periférica, em regime ambulatorial. Terai *et al* [98] infundiram CMMO separadas do aspirado de MO como em nosso protocolo, porém utilizaram a veia periférica e foi relatada melhora clínica (CP) e laboratorial (albumina e BT). Houve preocupação de analisar a expressão de fatores relacionados a regeneração em biópsias hepáticas. É especialmente interessante analisarmos nossos resultados frente aos estudos de Lyra *et al* pois é o desenho que mais se assemelha ao nosso protocolo. [103, 111] Os índices de melhora laboratorial foram quase idênticos assim como a melhora na pontuação de CP. Enquanto observamos complicações decorrentes da anestesia geral e da

arteriografia, os autores não relataram eventos adversos além de dor no local da aspiração de MO.

Quando nosso estudo foi desenhado, ainda não havia número significativo de publicações demonstrando o *homing* das CMMO para o fígado a partir de sítios não hepáticos. Observamos em nossos pacientes que mais de 1/4 da radiação permaneceu retida no fígado na cintigrafia de 24 horas, com uma relação fígado/baço em média de 5,63. Esta aparente vantagem do fígado em relação ao *homing* das CTMO merece ser melhor estudada para que possamos aproveitá-la em ensaios clínicos.

Em nosso estudo, utilizamos para análise da função hepática os níveis séricos de albumina e BT, o INR e os escores CP e MELD. Optamos por não considerar ascite e EH como parâmetros de melhora ou piora da função hepática, já que sua avaliação é subjetiva e suas manifestações são influenciadas por medicamentos. Mesmo quando são utilizados métodos de imagem para quantificação da ascite, sabemos que seu volume é influenciado por fatores corriqueiros como consumo de sal e aderência ao uso do diurético. Alguns estudos usam como estratégia fixar a dose de medicamentos para EH e ascite para eliminar essa variável, [98, 107] porém não julgamos tal proposta ética, deixando o ajuste de medicamento a cargo do médico assistente.

Apenas estudos controlados e de seguimento longo serão capazes de definir se a terapia com CTMO aumenta realmente o risco de hepatocarcinoma no paciente com cirrose. O paciente 6 apresentou CHC no USD e na TC de abdome de final de protocolo. Não podemos relacionar o evento diretamente com a infusão celular. Observamos CHC também em um dos pacientes controle, que nunca recebeu infusão celular.

O paciente 2 desenvolveu um transtorno imunomediado, a fasciíte eosinofílica, ou síndrome de Shulman, evento que relatamos e submetemos a publicação em revista indexada (Anexo 3). Trata-se de uma rara doença esclerodérmica caracterizada pela inflamação e fibrose dos septos subcutâneos e da fáscia muscular, acometendo preferencialmente os membros superiores. Fatores desencadeantes da forma espontânea incluem exercício físico extenuante e trauma local, todavia a fasciíte eosinofílica também pode surgir no espectro da GVHD crônica. A GVHD é uma síndrome de auto-agressão que ocorre tipicamente após o HSCT alogênico, no entanto quadros indistinguíveis já foram descritos após transplantes autólogos. O desenvolvimento da GVHD autóloga depende da perda da tolerância *self* e pode estar relacionada à disfunção do timo, sendo o regime de condicionamento com quimio/radioterapia um dos principais fatores de risco. Nakamura *et al* [121] descreveram em 2005 um caso dramático de GVHD autóloga cuja manifestação esclerodermóide assemelhava-se à fasciíte eosinofílica. Não encontramos na literatura relatos de fasciíte eosinofílica na ausência de regime de condicionamento ou relacionados à infusão de CMMO autólogas, porém não é possível descartar relação causal. O mesmo paciente também desenvolveu DM2. Embora existam relatos de DM2 desencadeado pelo HSCT autólogo, isto é atribuído ao regime de condicionamento ou a corticoterapia, o que não se aplica ao nosso protocolo. Cabe lembrar que o paciente apresentava história familiar de DM2 e que a própria cirrose hepática predispõe ao desenvolvimento da doença. A relação entre o desenvolvimento da doença e a infusão celular é, portanto, improvável.

Curiosamente, somente em nosso estudo foi registrada a ocorrência de complicações específicas da cirrose durante o período de seguimento, como CHC, HDA e PBE. Isto ocorreu a despeito da melhora laboratorial. Os períodos de

seguimento relativamente curtos (Tab. 3) podem ter contribuído para perda de eventos. Dentre os estudos publicados até o momento, 8 acompanharam seus pacientes por mais de 6 meses, porém apenas 2 os seguiram por 1 ano ou mais. (Tabela 1) Nossa opção por um seguimento de 12 meses nos permitiu observar mudanças da função hepática a médio prazo e quaisquer eventos adversos, estivessem eles relacionados ou não ao protocolo clínico instituído. Especialmente interessante foi a transitoriedade da melhora laboratorial que observamos, e a duração da estabilidade clínica no paciente 2 além do tempo de seguimento. Portanto, a manutenção da observação clínica mesmo após o final de seguimento, quando o paciente já havia retornado aos cuidados do médico assistente, foi uma decisão acertada. Segundo a descrição da evolução clínica individual em nossa casuística, pudemos constatar que a infusão em etapa única de CMMO não foi capaz de deter a história natural da cirrose e suas complicações.

7 CONCLUSÃO

A terapia com células-tronco autólogas de medula óssea na cirrose hepática:

1. é exequível
2. parece ser segura. Exceto pela fasciíte eosinofílica, cuja relação causal com a terapia celular não pode ser afastada, todos os eventos adversos observados estiveram relacionados aos procedimentos de coleta e infusão de células ou a manifestação da doença de base.
3. resultou em melhora bioquímica transitória, mas não induziu modificação significativa dos parâmetros clínicos de função hepática.

Baseando-se na técnica de marcação com radioisótopo, observou-se que o fígado reteve, após 24 horas, cerca de 1/4 do total de células infundidas.

8 RECOMENDAÇÕES

Naturalmente, são imprescindíveis estudos pré-clínicos para determinarmos os efeitos específicos de cada população de CTMO no fígado cirrótico. Da mesma forma, o possível comportamento pró-fibrótico ou mesmo carcinogênico das CTMO necessita de profunda investigação em modelos animais apropriados.

Com o crescimento das evidências em favor da segurança da terapia com CTMO em hepatologia, a multiplicação de estudos clínicos é previsível. Pesquisadores devem empregar, dentro do possível, métodos minimamente invasivos para coleta e infusão de células. Eventos adversos devem ser avaliados de forma padronizada e crítica com longos tempos de seguimento. Os efeitos sobre a função hepática devem ser correlacionados com análise imunohistoquímica, dados de cinética celular e dosagens de substâncias que possam auxiliar na elucidação de mecanismos.

Este estudo não foi desenhado para avaliação de eficácia. Posteriores estudos de fase II em nosso grupo deverão incluir grupo controle e desfechos apropriados. Caso a terapia celular seja comprovadamente segura e benéfica na cirrose hepática, seria interessante propô-la como ponte para o transplante e como alternativa para melhorar a sobrevida em pacientes não elegíveis para a cirurgia.

9 REFERÊNCIAS

1. Taub, R., *Liver regeneration: from myth to mechanism*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 836-47.
2. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 286-300.
3. Benyon, R.C. and J.P. Iredale, *Is liver fibrosis reversible?* Gut, 2000. **46**(4): p. 443-6.
4. Schuppan, D. and N.H. Afdhal, *Liver cirrhosis*. Lancet, 2008. **371**(9615): p. 838-51.
5. Burt, R.K., et al., *Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases*. Jama, 2008. **299**(8): p. 925-36.
6. Houlihan, D.D. and P.N. Newsome, *Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease*. Gastroenterology, 2008. **135**(2): p. 438-50.
7. Sutherland, F. and J. Harris, *Claude Couinaud: a passion for the liver*. Arch Surg, 2002. **137**(11): p. 1305-10.
8. Sheila Sherlock, J.D., *Anatomia e Função*, in *Doenças do Fígado e do Sistema Biliar*. 2004, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 2-14.
9. Schiff, E.R., M.F. Sorrell, and W.C. Maddrey, *Diseases of the Liver*. 8th ed. Vol. 1. 1999, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
10. Power, C. and J.E. Rasko, *Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration*. Ann Intern Med, 2008. **149**(6): p. 421-6.
11. Friedman, S.L., *Mechanisms of hepatic fibrogenesis*. Gastroenterology, 2008. **134**(6): p. 1655-69.
12. Tarla, M.R., et al., *A molecular view of liver regeneration*. Acta Cir Bras, 2006. **21 Suppl 1**: p. 58-62.
13. Issa, R., et al., *Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking*. Gastroenterology, 2004. **126**(7): p. 1795-808.
14. Iredale, J.P., 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): p. 538-49.
15. Issa, R., et al., *Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors*. Gut, 2001. **48**(4): p. 548-57.

16. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. 1994, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institute of Health: Bethesda, MD. p. 94-1447.
17. de Franchis, R., *Evolving consensus in portal hypertension. Report of the Baveno IV consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension*. J Hepatol, 2005. **43**(1): p. 167-76.
18. D'Amico, G., G. Garcia-Tsao, and L. Pagliaro, *Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies*. J Hepatol, 2006. **44**(1): p. 217-31.
19. Canabal, J.M. and D.J. Kramer, *Management of sepsis in patients with liver failure*. Curr Opin Crit Care, 2008. **14**(2): p. 189-97.
20. Tiani, C., J.G. Abraldes, and J. Bosch, *Portal hypertension: pre-primary and primary prophylaxis of variceal bleeding*. Dig Liver Dis, 2008. **40**(5): p. 318-27.
21. Raoul, J.L., *Natural history of hepatocellular carcinoma and current treatment options*. Semin Nucl Med, 2008. **38**(2): p. S13-8.
22. Sogaard, K.K., et al., *Portal vein thrombosis; risk factors, clinical presentation and treatment*. BMC Gastroenterol, 2007. **7**: p. 34.
23. Durand, F. and D. Valla, *Assessment of prognosis of cirrhosis*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(1): p. 110-22.
24. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices*. Br J Surg, 1973. **60**(8): p. 646-9.
25. Malinchoc, M., et al., *A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts*. Hepatology, 2000. **31**(4): p. 864-71.
26. Kamath, P.S., et al., *A model to predict survival in patients with end-stage liver disease*. Hepatology, 2001. **33**(2): p. 464-70.
27. *Regulamento Técnico Para Distribuição de Órgãos de Doadores Cadáveres Para Transplante*. 2006 [cited 2008 Jan 11]; Available from: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2006/GM/GM-1160.htm>.
28. Rodrigues, M.B., E.A. Junior, and S.K. Kodaira, *Anatomia ultra-sonográfica do abdome*, in *Ultra-sonografia abdominal*, C. GG, Editor. 2002, Revinter: Rio de Janeiro. p. 32-52.
29. Resende, C.M.C., *Doppler Hepático*, in *Radiologia e diagnóstico por imagem do abdome*, A.D. Dos Santos and M.S. Nacif, Editors. 2005, Rubio: Rio de Janeiro. p. 73-102.
30. Brancatelli, G., et al., *Cirrhosis: CT and MR imaging evaluation*. Eur J Radiol, 2007. **61**(1): p. 57-69.

31. Roberts, M.S., et al., *Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database*. Liver Transpl, 2004. **10**(7): p. 886-97.
32. Perry, I. and J. Neuberger, *Immunosuppression: towards a logical approach in liver transplantation*. Clin Exp Immunol, 2005. **139**(1): p. 2-10.
33. *Critérios para o cadastramento de candidatos a receptores de transplante de fígado - doador cadáver*. 2002 [cited 2008 Jan 11]; Available from: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002/Gm/GM-541.htm>.
34. Basto, S.T., Ribeiro, J., Perez, R. M., *Liver transplantation waiting list mortality and its characteristics in a Brazilian center (abstr.)*. Liver Transplantation, 2007. **13 Suppl 1**: p. 177.
35. Miranda, B., J. Vilardell, and J.M. Grinyo, *Optimizing cadaveric organ procurement: the catalan and Spanish experience*. Am J Transplant, 2003. **3**(10): p. 1189-96.
36. Smets, F., M. Najimi, and E.M. Sokal, *Cell transplantation in the treatment of liver diseases*. Pediatr Transplant, 2008. **12**(1): p. 6-13.
37. McKenzie, T.J., J.B. Lillegard, and S.L. Nyberg, *Artificial and bioartificial liver support*. Semin Liver Dis, 2008. **28**(2): p. 210-7.
38. Theise, N.D., *Stem cell research: elephants in the room*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(8): p. 1004-9.
39. Blau, H.M., T.R. Brazelton, and J.M. Weimann, *The evolving concept of a stem cell: entity or function?* Cell, 2001. **105**(7): p. 829-41.
40. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-48.
41. Phinney, D.G. and D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
42. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
43. Wexler, S.A., et al., *Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not*. Br J Haematol, 2003. **121**(2): p. 368-74.
44. Khoo, C.P., P. Pozzilli, and M.R. Alison, *Endothelial progenitor cells and their potential therapeutic applications*. Regen Med, 2008. **3**(6): p. 863-76.
45. Gussoni, E., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.

46. Mezey, E., et al., *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*. *Science*, 2000. **290**(5497): p. 1779-82.
47. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
48. Petersen, B.E., et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. *Science*, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
49. LaBarge, M.A. and H.M. Blau, *Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury*. *Cell*, 2002. **111**(4): p. 589-601.
50. Krause, D.S., et al., *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. *Cell*, 2001. **105**(3): p. 369-77.
51. Korbling, M., et al., *Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(10): p. 738-46.
52. Alison, M.R., et al., *Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells*. *Nature*, 2000. **406**(6793): p. 257.
53. Lagasse, E., et al., *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1229-34.
54. Theise, N.D., et al., *Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation*. *Hepatology*, 2000. **31**(1): p. 235-40.
55. Theise, N.D., et al., *Liver from bone marrow in humans*. *Hepatology*, 2000. **32**(1): p. 11-6.
56. Ting, A.E., et al., *Therapeutic pathways of adult stem cell repair*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. **65**(1): p. 81-93.
57. Popp, F.C., et al., *No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury*. *Stem Cells*, 2007. **25**(3): p. 639-45.
58. Quintanilha, L.F., et al., *Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis*. *Cell Transplant*, 2008. **17**(8): p. 943-53.
59. Carvalho, A.B., et al., *Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury*. *Stem Cells*, 2008. **26**(5): p. 1307-14.
60. Wang, X., et al., *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 897-901.
61. Vassilopoulos, G., P.R. Wang, and D.W. Russell, *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 901-4.

62. Abdel-Latif, A., et al., *Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(10): p. 989-97.
63. Perin, E.C., et al., *Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure*. Circulation, 2003. **107**(18): p. 2294-302.
64. Hernandez, P., et al., *Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation*. Atherosclerosis, 2007. **194**(2): p. e52-6.
65. Zietlow, R., et al., *Human stem cells for CNS repair*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 301-22.
66. Hoshino, K., et al., *In vivo tracking in cardiac stem cell-based therapy*. Prog Cardiovasc Dis, 2007. **49**(6): p. 414-20.
67. Goussetis, E., et al., *Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+ selected autologous bone marrow progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2279-83.
68. Overturf, K., et al., *Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1273-80.
69. Braun, K.M. and E.P. Sandgren, *Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 561-9.
70. Wang, X., et al., *The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11881-8.
71. Menthena, A., et al., *Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver*. Stem Cells, 2004. **22**(6): p. 1049-61.
72. Willenbring, H., et al., *Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver*. Nat Med, 2004. **10**(7): p. 744-8.
73. Kallis, Y.N., M.R. Alison, and S.J. Forbes, *Bone marrow stem cells and liver disease*. Gut, 2007. **56**(5): p. 716-24.
74. Sakaida, I., et al., *Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1304-11.
75. Zhao, D.C., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(22): p. 3431-40.

76. Fang, B., et al., *Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice*. Transplantation, 2004. **78**(1): p. 83-8.
77. Russo, F.P., et al., *The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis*. Gastroenterology, 2006. **130**(6): p. 1807-21.
78. Kisseleva, T., et al., *Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis*. J Hepatol, 2006. **45**(3): p. 429-38.
79. Forbes, S.J., et al., *A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis*. Gastroenterology, 2004. **126**(4): p. 955-63.
80. Alison, M.R., G. Murphy, and S. Leedham, *Stem cells and cancer: a deadly mix*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 109-24.
81. Sell, S. and H.L. Leffert, *Liver cancer stem cells*. J Clin Oncol, 2008. **26**(17): p. 2800-5.
82. Kashofer, K., E.K. Siapati, and D. Bonnet, *In vivo formation of unstable heterokaryons after liver damage and hematopoietic stem cell/progenitor transplantation*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 1104-12.
83. Yannaki, E., et al., *G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs*. Exp Hematol, 2005. **33**(1): p. 108-19.
84. Thorgeirsson, S.S. and J.W. Grisham, *Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence*. Hepatology, 2006. **43**(1): p. 2-8.
85. Lee, K.D., et al., *In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1275-84.
86. Kang, X.Q., et al., *Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(22): p. 3479-84.
87. Kuo, T.K., et al., *Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells*. Gastroenterology, 2008. **134**(7): p. 2111-21, 2121 e1-3.
88. Abdel Aziz, M.T., et al., *Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis*. Clin Biochem, 2007. **40**(12): p. 893-9.
89. Sato, Y., et al., *Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion*. Blood, 2005. **106**(2): p. 756-63.
90. Nauta, A.J. and W.E. Fibbe, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells*. Blood, 2007. **110**(10): p. 3499-506.

91. di Bonzo, L.V., et al., *Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential*. Gut, 2008. **57**(2): p. 223-31.
92. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
93. *Understanding Clinical Trials*. 2007 20/09/2007 [cited 2008 17/12/2008]; Available from: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/info/understand>.
94. Escosteguy, C.C., *Methodological and statistical topics in randomized controlled clinical trials*. Arq Bras Cardiol, 1999. **72**(2): p. 139-48.
95. am Esch, J.S., 2nd, et al., *Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration*. Stem Cells, 2005. **23**(4): p. 463-70.
96. Gaia, S., et al., *Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease*. J Hepatol, 2006. **45**(1): p. 13-9.
97. Gordon, M.Y., et al., *Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1822-30.
98. Terai, S., et al., *Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2292-8.
99. Yannaki, E., et al., *Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells*. Exp Hematol, 2006. **34**(11): p. 1583-7.
100. Di Campli, C., et al., *Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure*. Dig Liver Dis, 2007. **39**(12): p. 1071-6.
101. Furst, G., et al., *Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience*. Radiology, 2007. **243**(1): p. 171-9.
102. Gupta, D.K., et al., *Stem cells as a therapeutic modality in pediatric malformations*. Transplant Proc, 2007. **39**(3): p. 700-2.
103. Lyra, A.C., et al., *Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(7): p. 1067-73.
104. Mohamadnejad, M., et al., *Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(24): p. 3359-63.

105. Levicar, N., et al., *Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease*. Cell Prolif, 2008. **41 Suppl 1**: p. 115-25.
106. Spahr, L., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 221-9.
107. Mohamadnejad, M., et al., *Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis*. Arch Iran Med, 2007. **10**(4): p. 459-66.
108. Han, Y., et al., *Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis: peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy*. Cytotherapy, 2008. **10**(4): p. 390-6.
109. Pai, M., et al., *Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(8): p. 1952-8.
110. Yan, L., et al., *Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes*. Am J Hematol, 2007. **82**(11): p. 949-54.
111. Lyra, A., et al., *A pilot randomised controlled study used to evaluate efficacy of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with advanced chronic liver disease (abstr)*. Hepatology, 2007. **46**(Suppl 1): p. 217A.
112. Lorenzini, S., et al., *Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(10): p. 932-9.
113. Khan, A.A., et al., *Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study*. Transplant Proc, 2008. **40**(4): p. 1140-4.
114. Piscaglia, A.C., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 619-31.
115. Martin, P.J., et al., *Reporting of adverse event data in hematopoietic stem cell transplantation clinical trials involving investigational new drugs or devices: a report from the William Guy Forbeck Foundation 2001 focus meeting on clinical trials in hematopoietic stem cell transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2002. **8**(6): p. 295-302.
116. Ziser, A. and D.J. Plevak, *Morbidity and mortality in cirrhotic patients undergoing anesthesia and surgery*. Curr Opin Anaesthesiol, 2001. **14**(6): p. 707-11.
117. Liapi, E., et al., *Transcatheter arterial chemoembolization: current technique and future promise*. Tech Vasc Interv Radiol, 2007. **10**(1): p. 2-11.

118. Hendrickson, J.E. and C.D. Hillyer, *Noninfectious serious hazards of transfusion*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(3): p. 759-69.
119. Batinic, D., et al., *Relationship between differing volumes of bone marrow aspirates and their cellular composition*. *Bone Marrow Transplant*, 1990. **6**(2): p. 103-7.
120. Prasad, A., A. Lerman, and C.S. Rihal, *Apical ballooning syndrome (Tako-Tsubo or stress cardiomyopathy): a mimic of acute myocardial infarction*. *Am Heart J*, 2008. **155**(3): p. 408-17.
121. Nakamura, K., et al., *A case of sclerodermatous graft-versus-host disease following autologous peripheral blood stem cell transplantation*. *J Dermatol*, 2006. **33**(2): p. 135-8.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa “Terapia com células-tronco de medula óssea em hepatopatias”

Você está sendo convidado(a) para participar de uma pesquisa abordando a cirrose hepática em pacientes com indicação de transplante hepático, independentemente de estarem ou não listados na fila de transplante. Este documento serve para pedir o seu consentimento para participar desta pesquisa e para usarmos os resultados dos seus exames na elaboração desta pesquisa. Este trabalho em nada modificará o seu acompanhamento neste hospital e nada lhe custará financeiramente. Os procedimentos relativos a este estudo são todos gratuitos para os pacientes. O médico que até hoje foi responsável pelo seu acompanhamento neste hospital continuará sendo o seu médico, não modificando em nada o seu acompanhamento em função da inclusão no estudo. Caso prefira não participar do estudo, não haverá qualquer prejuízo para você, continuando a receber a mesma atenção de seu médico.

A cirrose hepática é uma doença que apresenta alta mortalidade, sendo causada principalmente pelo álcool ou pelos vírus da hepatite B ou C. Na fase avançada da cirrose, o único tratamento definitivo disponível hoje em dia é o transplante hepático, que apresenta algumas limitações, como a oferta de um fígado doado, os riscos da cirurgia e da anestesia e a necessidade de imunossupressão pelo resto da vida, para prevenção da rejeição ao órgão transplantado. Atualmente, a quantidade de órgãos para doação é bem menor do que a necessidade dos pacientes que aguardam na fila do transplante, fazendo com que o tempo de espera por um órgão esteja cada vez mais longo. Isto permite que a doença hepática evolua para estágios avançados, o que pode comprometer o resultado da cirurgia.

O objetivo deste estudo é avaliar se o implante de células retiradas da medula do osso do próprio indivíduo é seguro para o tratamento de pacientes com cirrose. Este é um tratamento experimental, para testar os efeitos agudos e crônicos destas células no fígado.

Por se tratar de células retiradas da própria pessoa, não há problemas de rejeição. É possível que, ainda assim, ocorram manifestações relacionadas ao sistema imunológico, como alterações de pele, e que exijam tratamento medicamentoso. Os efeitos colaterais que por acaso ocorrerem serão acompanhados de forma criteriosa e as medidas necessárias para a sua correção serão realizadas imediatamente, sem despesas para você.

Para realização desta pesquisa os pacientes serão separados em dois grupos, através de sorteio. Um grupo será submetido ao procedimento e o outro será acompanhado clinicamente e com os exames de rotina. Será necessário comparecer às visitas médicas programadas para o seu acompanhamento no ambulatório de Hepatologia do HUCFF, e também será acompanhado pelo médico do estudo, independente do grupo sorteado. A terapia celular ainda aguarda comprovação de sua segurança e eficácia e, caso se estabeleça como opção terapêutica, aqueles pacientes que constituírem o grupo controle terão prioridade em recebê-la.

A sua inclusão nesta pesquisa não afasta, em qualquer momento, a possibilidade de surgimento ou piora de complicações próprias da cirrose hepática. Dentre elas, ascite (líquido na cavidade abdominal), encefalopatia hepática (alteração mental consequente à doença do fígado), hemorragia digestiva (sangramento do estômago ou intestino), trombose de veia porta (coágulo na veia do fígado), tumor de fígado e mesmo evolução da cirrose com piora da função do fígado.

Se você for sorteado para receber o implante de células-tronco, deverá seguir o acompanhamento que constará de exame clínico, exames de sangue e radiológicos. No dia do tratamento você será internado, e preparado para a retirada das células da sua medula óssea, no Centro Cirúrgico. De barriga para baixo e sob anestesia geral, será feita limpeza da região do quadril, de ambos os lados. Serão realizadas cerca de 20 aspirações (10 em cada lado), obtendo-se um total de 100 ml de medula óssea. Este procedimento dura cerca de 40 minutos. Você acordará da anestesia logo após o término do procedimento e aguardará no quarto. As células retiradas serão preparadas em laboratório em condições adequadas. Após cerca de 3 horas você será encaminhado ao Setor de Hemodinâmica, onde será submetido à punção de uma artéria na virilha. Com auxílio de um aparelho de raio X, um cateter irá avançar até a sua artéria hepática (a artéria que leva sangue ao fígado), onde serão liberadas as células-tronco. Este procedimento dura cerca de uma hora, após o qual será feita a retirada do cateter e compressão do local da punção, por cerca de 30 minutos. Você permanecerá em repouso no leito até a manhã do dia seguinte, para evitar sangramento local.

Os riscos possíveis do procedimento podem estar relacionados à técnica da obtenção da medula óssea, da injeção das células ou a um efeito direto destas células sobre o fígado ou sobre outros

tecidos que com elas tenham contato. No primeiro caso, podem ocorrer dor, equimose e hematoma nos locais de punção óssea e complicações relacionadas à anestesia geral, como queda da pressão e problemas respiratórios. O risco da técnica de injeção é semelhante ao da arteriografia hepática, um procedimento relativamente freqüente, utilizado para investigação de nódulos no fígado. As complicações sérias são raras e incluem trombose e obstrução da artéria do fígado, além de desconforto ou infecção no local da punção, na região da virilha. Com relação ao risco de desenvolvimento de câncer, embora seja nossa principal preocupação, nenhum estudo em animais sugeriu que pudesse ocorrer. Apesar disto, todo paciente que receber as células-tronco deverá realizar freqüentemente os testes para detecção de algum nódulo tumoral. A formação de tumores e a obstrução da artéria do fígado, caso ocorra, poderá comprometer a função de seu fígado, necessitar de tratamento específico e mesmo reduzir sua expectativa de vida.

O material colhido e os dados obtidos deverão ser usados unicamente para esta pesquisa. Caso, posteriormente, surja novo interesse científico na utilização do material biológico e dos dados armazenados, a disponibilização dos mesmos só ocorrerá se você concordar com um novo TCLE, confeccionado para atender as demandas do novo projeto de pesquisa. Igualmente, se houver interesse no envio de material biológico para o exterior, você será consultado antecipadamente.

Para observação e segurança você ficará internado durante 3 dias, quando serão realizados exames de cintigrafia e de ultra-som abdominal, avaliações clínicas e laboratoriais, pela equipe médica do estudo. Terá alta no 3º dia e será acompanhado pela mesma equipe, no ambulatório, com consultas médicas após 7, 14, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 270 e 360 dias. As despesas com transporte e alimentação serão por conta da pesquisa.

Se a qualquer momento chegar a sua vez de ser transplantado, você terá seus direitos garantidos e será preparado para a cirurgia, sem haver nenhuma modificação ou prejuízo quanto a realização do transplante hepático, independente de ter sido submetido à infusão de células-tronco.

É importante esclarecer que todos estes exames são realizados de rotina pela Instituição para diagnóstico e tratamento de várias outras doenças, e que todos os resultados lhe serão informados e constarão no seu prontuário deste hospital. As informações de cada paciente serão tratadas com extremo sigilo médico, com garantia de privacidade destas informações, com a reponsabilidade do pesquisador.

O resultado da pesquisa "Terapia com células-tronco de medula óssea em hepatopatias" será posteriormente divulgado em meio científico para que as informações possam ser estudadas e aplicadas em outros Centros Médicos.

Além disso, em qualquer etapa deste estudo, estarei a disposição para quaisquer esclarecimentos todas às segundas-feiras, no período da manhã, no Ambulatório de Hepatologia deste hospital, também através do tel (21) 9997-6292, ou ainda pelo e-mail: g.rezende@superig.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sala 01D-46- 1º andar, HUCFFº, telefone (21) 2562-2480 – e-mail: ccp@.hucff.ufrj.br.

Cabe ressaltar que a não aceitação de participação neste protocolo de pesquisa, não implicará em prejuízo ao seu atendimento neste hospital.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta instituição.

Assino o presente documento em duas vias de igual teor e forma, ficando uma em minha posse.

_____, _____ de _____ de _____.
(Local) (dia) (mês) (ano)

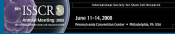
Nome e Assinatura do sujeito da pesquisa:

Nome e Assinatura do pesquisador responsável:


ANEXO 2

Trabalho apresentado em congresso mundial

ISSCR (International Society for Stem Cell Research), 2008




**AUTOLOGOUS BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS
INFUSION IN LIVER CIRRHOSIS: TRANSIENT EFFECT IN A ONE YEAR
FOLLOW-UP CLINICAL TRIAL**



REZENDE, GFM¹, COUTO, BG¹, FONSECA, LMB², GUTTILEN, B², RESENDE, CMC³, AZEVEDO, FS², PEDRAS, PSV², MERCANTE, DR¹, ANJOS, AL¹, TORRES, ALM¹, COELHO, HSM¹, CARVALHO, ACC⁴, GOLDENBERG, RCS⁴

¹Internal Medicine Department, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ²Radiology Department, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Division of Clinical Research, Laranjeiras National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil



INTRODUCTION

Recently, peripheral infusion of autologous bone marrow cells led to liver function improvement in cirrhotic patients. We conducted a one-year trial in adult patients with liver cirrhosis that received autologous bone marrow-derived mononuclear cells (ABMMC). (ClinicalTrials.gov ID NCT00382278).

OBJECTIVE

To evaluate feasibility, safety and kinetics of cellular therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells (ABMMC) in patients with liver cirrhosis in a transplantation waiting list.

PATIENTS AND METHODS

Enrolled patients had moderate liver dysfunction and liver transplantation was not expected to occur earlier than 12 months, due to a low MELD score. Etiology of cirrhosis was hepatitis C in 6 patients (with previous alcohol abuse in one); nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in one patient; and previous alcohol abuse alone in one patient. Concurrent hepatocellular carcinoma and hepatic artery or portal vein thrombosis were excluded by color Doppler ultrasonography (DUS) and 3-phase computed tomography (CT).

Under local anesthesia, 100 mL of bone marrow was aspirated from the posterior iliac crest. ABMMC were isolated by density gradient centrifugation in Ficoll-Hypaque gradient, 10% of the cells were labeled with SnCl₂-99mTc, and a small fraction was used for cell counting and viability analysis. Celiac trunk catheterism was performed in order to deliver the ABMMC suspension in the common hepatic artery. Total body scintigraphy (TBS) was performed 3 and 24 hours after infusion.

Patients were submitted to frequent clinical, biochemical and image evaluation during the follow-up period.

e-mail: g.rezende@supcrig.com.br

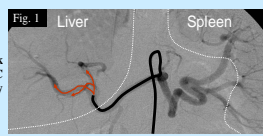


Fig. 1: Schematic celiac trunk catheterism delivering ABMMC in the common hepatic artery

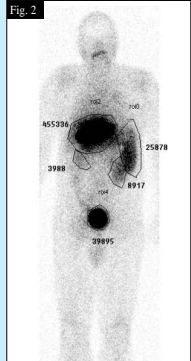


Fig. 2: Total body scintigraphy 3 hours after ABMMC infusion showing radiotracer distribution in liver, spleen, kidneys and gums, and excretion in bladder

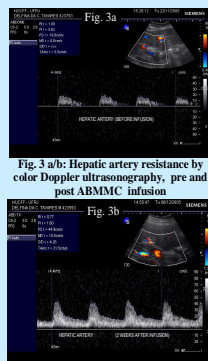


Fig. 3 a/b: Hepatic artery resistance by color Doppler ultrasonography, pre and post ABMMC infusion

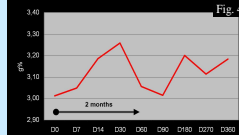


Fig. 4: Serum albumin (mean and individual): initial improvement, posterior falls secondary to clinical events (bleeding and infection)

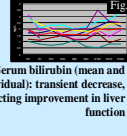


Fig. 5: Serum bilirubin (mean and individual): transient decrease, reflecting improvement in liver function

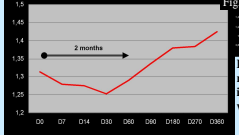


Fig. 6: INR (mean and individual) reflecting slight, non-sustained improvement in coagulation, with worsening by the end of follow-up

RESULTS

Eight patients received 2.0 - 15 x 10⁸ cells. In the 3rd hour TBS, 30 to 60% of all labeled cells were retained in the liver. Liver radiation was greater in patients who received cells farther from the celiac trunk bifurcation. After infusion, DUS showed a decrease in hepatic artery resistance index in 6 patients, remaining for at least 3 months.

Regarding liver function, 7 patients experienced a rise in serum albumin levels, with a small though progressive increase in 4 patients that persisted till the end of protocol. Albumin mean levels rose from 3.01 g/dL before ABMMC infusion to 3.2 g/dL at day 360, with higher values at day 30. A transient decrease in total bilirubin serum level was observed in all patients, more evident between day 30 to 90. INR improved slightly in the first two months, but quickly returned to baseline and to higher levels at the end of follow-up.

Transient, significant laboratorial deterioration in liver function occurred in two patients, due to gastric variceal bleeding and extensive lower limb cellulitis. Another patient developed two episodes of erysipela and, at day 300, new-onset diabetes mellitus followed by eosinophilic fasciitis, a dermatological manifestation of autoimmune disease that has been described following ABMMC infusion (5th ISSCR Meeting, 2007, Poster Board TUE-368). A patient who initially showed laboratorial improvement underwent liver transplantation at month 2, but died due to surgical complications. One patient was diagnosed with HCC on day 360 and has been managed accordingly. No vascular complications were shown on DUS and CT scan at the end of follow-up.

CONCLUSION

According to our results, infusion of ABMMC in the hepatic artery in cirrhotic patients is feasible and seems to be safe, with complications being unrelated to cell infusion. The procedure possibly contributes to improve liver function, although some benefits may fade away after months. Cell labeling and scintigraphic studies can be useful to understand cell kinetics while DUS may reveal hemodynamic consequences of cell homing in clinical stem cell research protocols.

ANEXO 3

Artigo submetido a publicação



Eosinophilic fasciitis following autologous stem cell therapy in liver cirrhosis

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>International Journal of Dermatology</i> |
| Manuscript ID: | IJD-2009-0135 |
| Manuscript Type: | Report |
| Date Submitted by the Author: | 05-Feb-2009 |
| Complete List of Authors: | Couto, Bianca; Federal University of Rio de Janeiro, Internal Medicine, Hepatology Sampaio, Ana Luisa; Rio de Janeiro State University, Dermatology Moreira, Maria Cláudia; Federal University of Rio de Janeiro, Hematology Jeunon-Sousa, Maria; Rio de Janeiro State University, Dermatology Coelho, Henrique Sérgio; Federal University of Rio de Janeiro, Internal Medicine, Hepatology Carvalho, Antonio Carlos; Federal University of Rio de Janeiro, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute Goldenberg, Regina; Federal University of Rio de Janeiro, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute Rezende, Guilherme; Federal University of Rio de Janeiro, Internal Medicine, Hepatology |
| Keywords: | fibrosing disorders, skin diseases in transplant recipients, immunology |
| | |

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](#)