



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **MONOGRAFIA**

# **Potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas em hepatócitos, em modelo experimental de insuficiência hepática aguda**

- Nome do Estudante: Judah Leão Barouh  
Correio eletrônico: judah\_leao@hotmail.com  
Curriculum vitae /base CNPq-Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5358159878605271>
- Nome do Professor orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas  
Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da  
Bahia da Universidade Federal da Bahia  
Correio eletrônico: freitas.luizar@gmail.com

Salvador (Bahia)  
2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Leão Barouh, Judah Leão

Potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas em hepatócitos, em modelo experimental de insuficiência hepática aguda / Judah Leão Leão Barouh. -- Salvador, 2018.

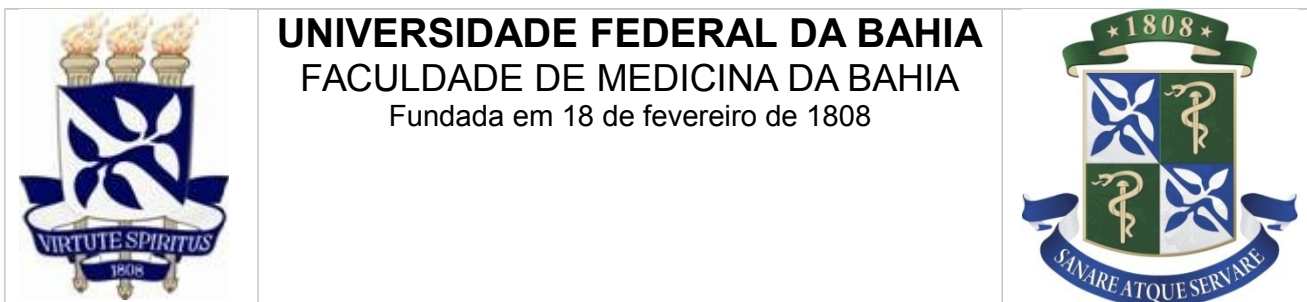
64 f. : il

Orientador: Luiz Antônio Rodrigues de Freitas.

TCC (Graduação - Medicina) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de medicina da bahia, 2018.

1. Terapia celular. 2. Reprogramação hepática. 3. Hepatócitos. 4. Patologia. 5. Imunofluorescência. I. Rodrigues de Freitas, Luiz Antônio. II. Título.

CDU:61



## MONOGRAFIA

# **Potencial terapêutico de células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas em hepatócitos, em modelo experimental de insuficiência hepática aguda**

**Judah Leão Barouh**

Professor orientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B33/2017.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Agosto, 2018

**Monografia:** *Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas, em hepatócitos em modelo experimental de insuficiência hepática aguda*, de **Judah Leão Barouh**.

Professor orientador: **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Luiz Antônio Rodrigues de Freitas**, Professor do Departamento de Medicina Legal e Patologia da Universidade Federal da Bahia.
- **Helma Pinchemel Cotrim**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Universidade Federal da Bahia.
- **Simone Garcia Macambira**, Professora do Departamento de Biorregulação da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VIII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

**TEOGONIA-O MITO DE PROMETEU,507**

Hesíodo

“Pois este destino lhe designou o prudente Zeus.  
Atou com inquebrantáveis amarras Prometeu pleno de idéias,  
Grilhões dolorosos passados em meio a uma coluna,  
E sobre ele instigou uma águia de largas asas. Esta o fígado  
Imortal comia, regenerando-se nas mesmas proporções,  
Durante a noite, o comido de dia pela ave de largas asas.”

Aos meus pais, **Davi e Marcia**

**EQUIPE:**

- Judah Leão Barouh, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA.
  - Correo-e: judah\_leao@hotmail.com;
- Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA; Fundação Oswaldo Cruz-Bahia/FIOCRUZ-BA;
- Bruno Solano de Freitas Souza, Fundação Oswaldo Cruz-Bahia/ FIOCRUZ-BA; Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael/ HSR-CBTC;
- Iasmim Diniz Orge, Fundação Oswaldo Cruz-Bahia/ FIOCRUZ-BA; Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael/ HSR-CBTC;
- Milena Botelho Pereira Soares, Fundação Oswaldo Cruz-Bahia/ FIOCRUZ-BA; Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael/ HSR-CBTC;

**INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES****UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

- FIOCRUZ-BA-Laboratório de Imunofarmacologia e Engenharia Tecidual

**HOSPITAL SÃO RAFAEL**

- Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC)

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. CNPq</li><li>2. Hospital São Rafael-Centro de Biotecnologia e Terapia Celular</li><li>3. IGM-FIOCRUZ-BA</li><li>4. Recursos próprios</li></ol> |
|---|

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio Rodrigues Freitas, pela sabedoria compartilhada, ensinamentos e presença constante.
- À Dr. Bruno Solano pelos diversos ensinamentos, orientações acadêmicas e servir como modelo de profissional médico que quero ser.
- À Mestranda Iasmim Orge pelo apoio constante e ajuda na realização de diversos momentos dessa monografia.
- À minha banca revisora, composta por Prof.Dra Helma Cotrim e Prof.Dra Simone Macambira, pela disponibilidade de seu tempo e ajuda na correção e aperfeiçoamento deste trabalho.
- À Dra. Milena Soares e toda equipe do CBTC/LETI pela supervisão e ajuda constante durante todo processo.
- Aos meus pais e irmã, Davi, Marcia e Iasmim pelo estímulo, amor e presença constante.
- À Laila Damasceno Andrade, pelo afeto incondicional e ajuda na formatação desse texto.



## SUMÁRIO

1. RESUMO	
2. OBJETIVOS	6
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3.1 Contexto	7
3.1.1 Epidemiologia	7
3.1.2 Aspectos Clínicos e Tratamento Atual	7
3.1.3 Mecanismo de Lesão do Aetoaminofeno	8
3.1.4 Terapia Celular	9
3.1.5 Células Tronco Mesenquimais	10
3.1.6 Introdução de Células Tronco Mesenquimais em Hepatócitos	11
3.2 Revisão da Literatura	13
3.2.1 Introdução	13
3.2.2 Terapia Celular das Doenças Hepáticas Metabólicas	14
3.2.3 Terapia Celular em Insuficiência Hepática Aguda	15
4. METODOLOGIA	17
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÕES	31
8. SUMMARY	32
9. REFERENCIAS	33
10. ANEXOS	41
ANEXO I	41
ANEXO II	48
11. APÊNDICES	55
APÊNDICE I	55
APÊNDICE II	56

## 1. RESUMO

**Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas, em hepatócitos em modelo experimental de insuficiência hepática aguda.**

**Introdução:** A elevada prevalência de hepatopatias na população em geral tem levado a constante busca por novas alternativas terapêuticas, que visem o tratamento e/ou cura de tais doenças. Atualmente, o uso da terapia celular a partir de células tronco mesenquimais vem crescendo cada vez mais como uma alternativa viável. Uma vez que se pode utilizar células do próprio portador da doença, contornando problemas como rejeição pelo sistema imune. Porém, ainda diversos problemas necessitam ser superados como: aquisição de grande quantidade de células viáveis para uso na terapia celular e uma maior adesão destas células no órgão lesado. O presente estudo visa estabelecer a efetividade da terapia celular promovida por hepatócitos derivados de células tronco mesenquimais (iHeps) como alternativa terapêutica, em modelo experimental de insuficiência hepática aguda induzida por acetoaminofeno em camundongos C57Bl/6.

**Metodologia:** Utilizaram-se camundongos C57Bl/6 que durante três semanas fizeram uso de etanol a 10% *ad libitum* em substituição à água. Posteriormente, foram injetados 450 mg/kg de acetoaminofeno, diluído em salina por via intraperitoneal, para indução de lesão hepática aguda. Quatro horas após administração do acetoaminofeno, fez-se o transplante de iHEPs ( $2 \cdot 10^6$  células/camundongo), por via intra-hepática. Utilizou-se imunofluorescência para rastreamento das células e verificação de proliferação no parênquima hepático (48 horas e 2 semanas após o transplante). A análise de sobrevivência destes, foi feita durante sete dias. **Resultados:** Estabeleceu-se a curva de mortalidade proposta no modelo com uso de etanol 10% durante 3 semanas e injeção de 450mg/kg de acetoaminofeno; por imunofluorescência foi possível demonstrar hepatócitos transdiferenciados aderidos e proliferando no parênquima hepático. A análise de sobrevivência não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação à mortalidade. **Conclusão:** As células demonstraram capacidade de enxertia e proliferação no modelo de insuficiência hepática aguda por acetoaminofeno. Não foi possível estabelecer um impacto na sobrevivência desses camundongos, nesse modelo experimental.

**Palavras chaves:** 1. Terapia celular; 2. Reprogramação hepática; 3. Hepatócitos; 4. Patologia; 5. Imunofluorescência.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AAT	Alfa anti-tripsina
AFP	Alfa-fetoproteína
Alb	Albumina
CK18	Citoqueratina 18
CT	Célula Tronco
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CYP	Citocromo P450
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF-4	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HNF4 $\alpha$	<i>Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math></i>
iHEP	<i>Induced hepatocyte-like cell</i>
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
SOX17	<i>SRY-Box 17</i>
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinona imina
JNK	<i>Janus Kinase</i>
DALYS	<i>Disability-adjusted life year</i>
GFP	<i>Green Fluorescent protein</i>
Anti-GFP	Anticorpo anti-GFP

**LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS**

<b>Tabela 1.</b> Estudos conduzidos em humanos com doença hepática metabólica, que foram submetidos ao transplante de hepatócitos.	41
<b>Tabela 2.</b> Estudos conduzidos em humanos com insuficiência hepática aguda por diversas causas e tratados com terapia celular com hepatócitos	48
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos utilizados para marcação de imunofluorescência.	19
<b>Tabela 4.</b> Anticorpos utilizados na marcação de imunofluorescência	22
<b>Gráfico 1.</b> Curva de letalidade com uso de acetoaminofeno 450mg/kg	21
<b>Gráfico 2.</b> Curva de letalidade com uso de álcool 10% (3 semanas) + acetoaminofeno 450mg/kg	21
<b>Gráfico 3.</b> Impacto da terapia celular sobre mortalidade	27

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos de lesão pelo acetaminofeno	9
<b>Figura 2.</b> Diferenciação das Células Tronco Mesenquimais	11
<b>Figura 3.</b> Desenvolvimento hepático	13
<b>Figura 4.</b> Modelo de lesão hepática aguda e transplante das iHEPs	18
<b>Figura 5.</b> Análise da localização das iHEPs após 48 horas	25
<b>Figura 6.</b> Análise da localização das iHEPs após 2 semanas	26
<b>Figura 7.</b> Análise da enxertia e proliferação das iHEPs após 2 semanas	26
<b>Figura 8.</b> Curva de Kaplan-Meier	28

## **2. OBJETIVOS**

### PRINCIPAL

Avaliar o potencial terapêutico do transplante de hepatócitos derivados de células-tronco mesenquimais em modelo experimental de lesão hepática aguda.

### SECUNDÁRIOS:

1. Avaliar o impacto da terapia celular sobre a sobrevivência dos animais em modelo experimental de insuficiência hepática aguda induzida por acetoaminofeno;
2. Analisar parâmetros bioquímicos de lesão e função hepáticas a partir de amostras do sangue periférico;
3. Rastrear e determinar o destino e a retenção das células transplantadas por via intra-hepática a partir de técnicas de imunofluorescência.

## **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1 CONTEXTO**

#### **3.1.1 EPIDEMIOLOGIA**

Doenças hepáticas têm elevada prevalência, morbidade e mortalidades em todo o mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015 estima-se que 257 milhões de pessoas eram portadoras de hepatite B e 71 milhões de pessoas portadoras de hepatite C, sendo que dessas, pode se admitir que 1,3 milhões de mortes a falência hepática em decorrência das hepatites virais <sup>72</sup>.

Em uma análise mais ampla, incluindo outras doenças hepáticas, pode-se ver que a mortalidade em decorrência da cirrose hepática, estágio final de diversas doenças

parenquimatosas do fígado, é a décima terceira causa de morte no mundo, tendo sua mortalidade aumentado 45,6% de 1990 a 2013. É, responsável por cerca de 2% das mortes no mundo, causando 31 milhões de DALYS que significa anos de vida adaptados a incapacidade<sup>42,1</sup>.

No Brasil, os dados sobre a prevalência das hepatopatias estimam que dentre as 117.979.343 internações que ocorreram no Sistema Único de Saúde (SUS) nos anos de 1990 a 2010, 853.571 foram em decorrência de doenças hepáticas, correspondendo a 0,72% do total de internações nesse período. Entre os anos de 2001 a 2010, a insuficiência hepática aguda e subaguda se constituíram como a terceira maior causa de internação dentre as causas hepáticas, contando com 73.384 internações<sup>44</sup>. Atualmente, o tratamento mais eficaz para hepatopatias graves é o transplante de fígado, porém este procedimento possui diversas limitações como a falta de doadores compatíveis, alto custo, alto índice de complicações, alta taxa de morbidade/mortalidade<sup>30</sup>. Torna-se, portanto, necessária a busca por novas terapias que possam vir a ser eficazes na terapêutica das hepatopatias graves.

### **3.1.2 ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO ATUAL**

A lesão hepática aguda é uma grave e rápida lesão progressiva do parênquima hepático, que pode cursar com diversos distúrbios como: encefalopatia hepática, coagulopatia e icterícia, podendo progredir rapidamente para falência sistêmica de diversos órgãos; cabendo destacar a ocorrência da encefalopatia, que por diversas vezes é marcante e pode significar uma piora do quadro clínico, sendo esta normalmente classificada pela escala de WEST-HAVEN (Apêndice II)<sup>6</sup>. A insuficiência hepática aguda tem uma incidência média de 1-6 casos por milhão de pessoas por ano. Dentre suas diversas causas, se destaca a lesão hepática aguda por intoxicações causadas por medicamentos, incluindo acetoaminofeno que acomete em sua maioria jovens, sendo um grande dano para a população economicamente ativa<sup>4</sup>. Em casos de intoxicação aguda por acetoaminofeno, pode se utilizar N-acetilcisteína, como antídoto, com melhora do quadro para os pacientes tratados precocemente e com encefalopatia leve. Entretanto, ainda permanece como única opção terapêutica o transplante hepático para pacientes que não conseguem ser precocemente tratados e passam a apresentar um agravamento do quadro de encefalopatia<sup>57</sup>. Atualmente, o manejo clínico destes pacientes é limitado e consiste em monitoramento contínuo para prevenção da piora do quadro, suporte nutricional e hemodinâmico, tratamento das complicações em unidade

fechada (UTI) até recuperação do dano hepático e estabilidade hemodinâmica. Para melhora definitiva do quadro, a opção é o transplante hepático, como previamente citado, limitando muito as opções terapêuticas<sup>35</sup>. Isto nos incita a estudar uma opção terapêutica para estes pacientes cuja sobrevida é baixa em decorrência das poucas opções terapêuticas e gravidade do quadro.

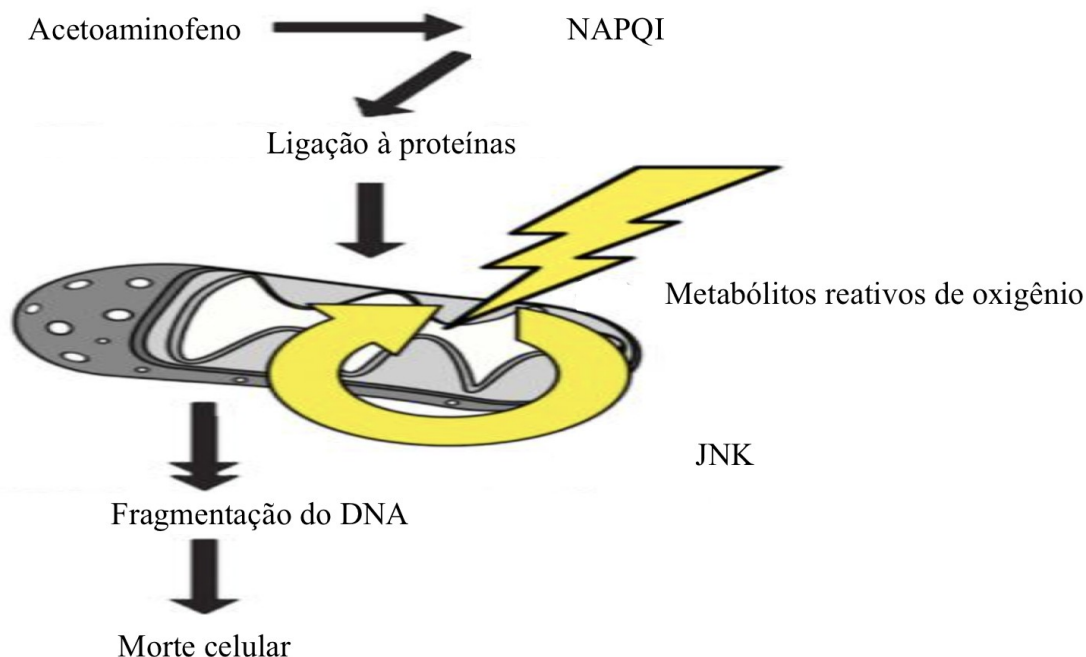
### **3.1.3 MECANISMO DE LESÃO DO ACETOAMINOFENO**

O mecanismo de lesão hepática do acetoaminofeno (paracetamol) se dá através da formação de metabólitos ativos, formados a partir da metabolização do mesmo. Tais metabólitos induzem o dano por ação direta ou induzindo a formação de haptenos que induzem mecanismo imunes de toxicidade celular<sup>31</sup>.

O dano se inicia a partir da formação do metabólito reativo N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) pela enzima CYP 450. Apesar de o NAPQI poder ser prontamente metabolizado através da conjugação com a glutathione e com isso ser detoxificado, porém a glutathione se encontra restrita em casos de overdose; com isso o metabólito NAPQI fica livre na célula podendo causar diversos danos.

A NAPQI confere dano através da ligação de enzimas citosólicas e principalmente mitocondriais. Essa ligação da enzima à proteínas mitocondriais ocasiona a formação de metabólitos reativos de oxigênio. Nota-se então uma perda do pareamento no processo de respiração celular que se dá dentro da mitocôndria. Toda essa cascata leva a um estresse oxidativo que ocasiona a formação do poro de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial, levando à morte da célula (Figura 1).





**Figura 1: Mecanismos de lesão pelo acetoaminofeno.** Esquema ilustrativo demonstrando a formação do metabólito NAPQI, com sua ligação a proteínas mitocondrias, induzindo a formação de metabólitos ativos. É possível notar também a participação da enzima JNK, que faz parte dos complexos de proteínas ativas pro mitógenos. A JNK tem papel importante aumentando o estresse oxidativo e com isso a fragmentação do DNA e consequente morte celular. Adaptado de JAESCHKE, XIE & MCGILL.,2014.

### 3.1.4 TERAPIA CELULAR

A terapia celular vem sendo estudada de forma intensa nos últimos anos e é considerada uma promissora alternativa ao transplante hepático. O uso de hepatócitos primários, de células tronco, de hepatócitos derivados de células tronco ou até mesmo de organoides hepáticos vem sendo testado em modelos animais e em alguns casos humanos como uma alternativa promissora. Entretanto, há ainda determinados fatores limitantes, como a dificuldade de preservação e manutenção, desses hepatócitos sejam eles primários ou derivados de células tronco, a sua baixa adesão ao órgão alvo e sua viabilidade no paciente recém transplantado <sup>13,70</sup>.

Tendo em vista tais fatores, novas estratégias vêm sendo estudadas para geração de hepatócitos através de fontes extras autólogas que promovam e facilitem não só o seu uso terapêutico, mas também como ferramenta de estudo *in vitro* mais qualificada para

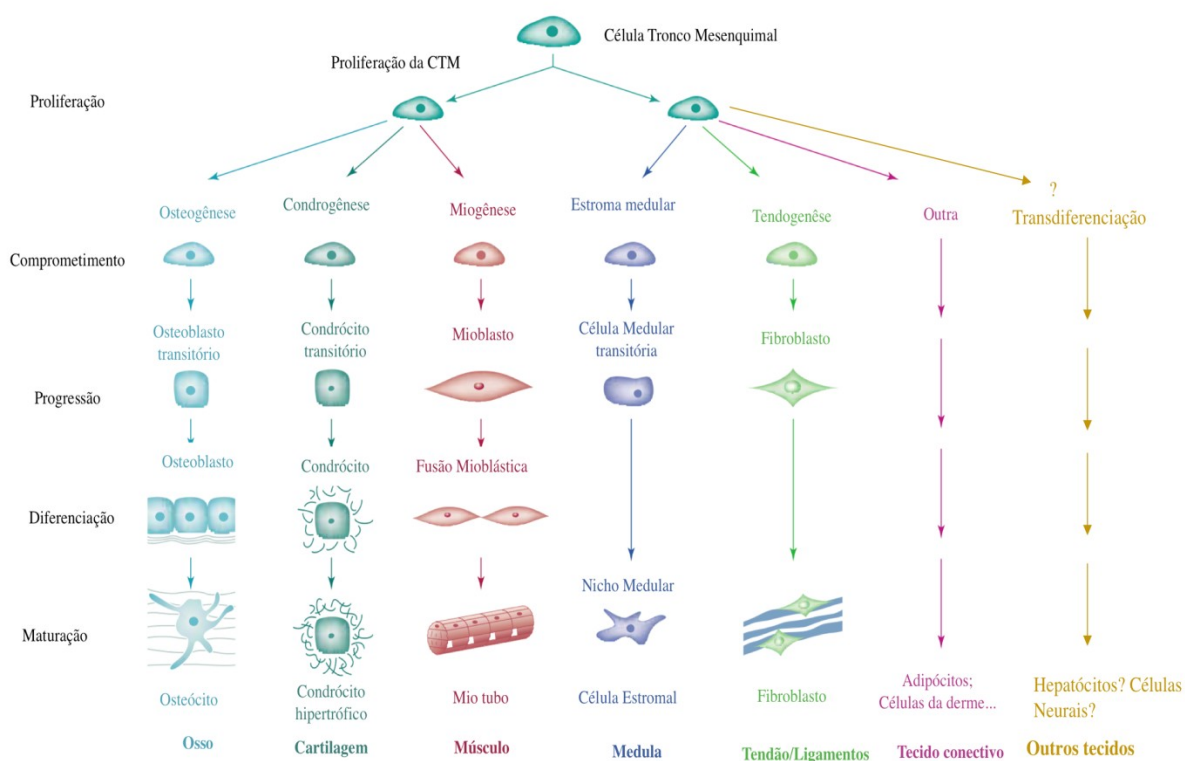
utilização em testes de toxicidade, descoberta de novos medicamentos ou estudo do metabolismo celular hepático.

### 3.1.5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

O organismo possui diversas células com capacidade de auto renovação e diferenciação, seja de forma ilimitada ou por um determinado período. Tais células acabaram por ser reconhecidas como células tronco (CT), podendo estas serem classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação em: totipotentes, capazes de se diferenciar em qualquer tipo do folheto embrionário ou extraembrionário; pluripotentes, capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular do folheto embrionário; multipotentes, capazes de se diferenciar em um subconjunto específico de tipos celulares de um mesmo folheto embrionário; onipotentes, células que somente originam somente um tipo celular maduro <sup>66</sup>. Ainda nesse âmbito, surgiu recentemente o conceito de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC), que são geradas a partir da superexpressão de alguns fatores de transcrição em células “adultas” somáticas e com isso promover um estado de pluripotência <sup>66</sup>.

As células tronco mesenquimais (CTM) se apresentam como células tronco multipotentes, com potencial de diferenciação em diversas linhagens mesenquimais e apresentando características imunomodulatórias, surgindo como uma fonte possível para terapia celular<sup>10</sup>. Devido a sua possível grande heterogeneidade morfológica esta necessita ser caracterizada pela expressão de marcadores CD105, CD73 e CD90 e a falta de expressão de marcadores hematopoiéticos CD45, CD30, CD14 e/ou CD11b, CD79alpha ou CD19 e HLA-DR<sup>14,49</sup>.

As CTM podem ser isoladas de diversos tecidos (tecido adiposo, muscular esquelético, sinovial, poupa dentária, geleia de Wharton, placenta, dentre outros), sendo esse isolamento feito, principalmente, através de sua característica de adesão ao plástico; tais células têm ainda demonstrando capacidade de diferenciação em outras linhagens (Figura 2) através de técnicas de engenharia genética, podendo originar células semelhantes a cardiomiócitos, hepatócitos e neurônios <sup>9,46</sup>.



**Figura 2: Diferenciação das células tronco mesenquimais.** Na figura, pode-se observar as linhagens nas quais as CTM, comumente, se diferenciam (osso, cartilagem, músculo, medula, tendão/ligamentos e tecido conectivo). É possível reparar na capacidade da mesma se transdiferenciar, gerando células de outros tecidos como hepatócitos, através de técnicas de engenharia genética. Adaptado de Caplan & Bruder, 2001.

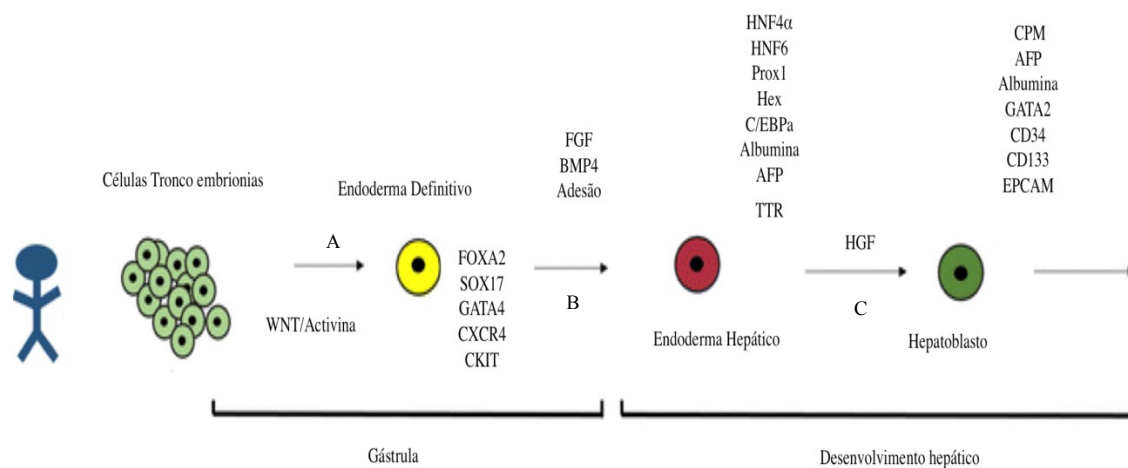
### 3.1.6 INDUÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM HEPATÓCITOS

Como já explicitado, as células tronco mesenquimais possuem diversas características imunomodulatórias e capacidade de se diferenciar em outras linhagens. O processo de transdiferenciação se dá principalmente através de técnicas de modificação genética, através do uso de vetores lentivirais (subgrupo de retrovírus) ou vetores não virais como DNA em formato de plasmídeo ou lipossoma <sup>45</sup>. Os vetores virais têm tido amplo destaque, pois estes normalmente possuem uma capacidade de induzir estados de superexpressão de forma mais destacada, enquanto vetores não virais apresentam baixa eficiência transdutoria, apesar de possuírem características de amplo interesse como baixa imunogenicidade, toxicidade e, conseqüentemente, menor risco <sup>45</sup>. Além disso, o

uso de diversos fatores epigenéticos tem demonstrando imensa importância na diferenciação de tais células.

Na conjuntura da diferenciação das CTM em hepatócitos, tem sido descrito e usado vetores lentivirais associados à suplementação de fatores e citocinas com importante papel na diferenciação dessas células em hepatócitos. Dentro desse contexto cabe destacar os fatores de transcrição Forkhead Box A protein 2 (FOXA2) e Hepatocyte Nuclear Factor 4a (HNF4 $\alpha$ ), importantes no processo de diferenciação do hepatócito<sup>44</sup>. O FOXA2 está relacionado a polarização e adesão das células, atuando de forma determinante na diferenciação desta para endoderma definitivo (estágio precursor de células precursoras hepatopancreáticas)<sup>8</sup>. Já, o HNF4 $\alpha$  começa a ser expresso em uma fase posterior e perdura até a maturação completa dos hepatócitos, sendo importante na expressão de proteínas de adesão e junção celular, papel este importantíssimo no desenvolvimento hepático. O HNF4 $\alpha$  também desempenha importante papel como um regulador na transcrição de diversos genes relacionados ao desenvolvimento de toda fase de gástrula<sup>70</sup>. A figura 3 ilustra o processo de diferenciação hepática e fatores cruciais expressos durante esse processo.

Com a utilização de técnicas de engenharia genética, para a expressão de genes importantes no desenvolvimento do hepático, como os fatores de transcrição FOXA2 e HNF4 $\alpha$ , assim como com a suplementação de importantes fatores e citocinas em meio de cultura como *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF4), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP4), *Epidermal Growth Factor* (EGF) é possível se obter células morfológica e funcionalmente semelhantes a hepatócitos, que foram chamadas na literatura de iHEP<sup>15,44,48</sup>. Com o processo de transdiferenciação para hepatócitos, tais células podem vir a ser utilizadas como alternativa terapêutica e testadas em modelos experimentais de lesão hepática aguda em camundongos (HUANG *et al.*, 2011; SUZUKI, 2011), a fim de avaliar seu potencial uso em seres humanos. Apesar das CTM serem uma fonte de fácil acesso e grande capacidade de auto renovação, não há protocolo de reprogramação bem estabelecido, sendo necessário a utilização de novas técnicas e modelos para estabelecimento de seu real potencial terapêutico.



**Figura 3: Desenvolvimento hepático.** Esquema ilustrativo de algumas etapas do processo de diferenciação das CT embrionárias para o estágio de endoderma definitivo. (A) pPrimeira etapa de diferenciação com a participação dos fatores (WNT e Activina); (B). Segundo estágio de diferenciação, diferenciação em endoderma hepático com a participação do FOXA2, associado aos fatores FGF, BMP e adesão entre essas células. (C) Progressão para o estágio de endoderma hepático com destaque para o HNF4a, mediador no processo de maturação para hepatoblasto. Adaptado de Ogoke & Parashurama, 2017.

## 3.2 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.2.1 INTRODUÇÃO

O uso de hepatócitos para terapia em doenças hepáticas tem sido estudado há pelo menos 40 anos, quando em 1976 foi feito o primeiro experimento de terapia com hepatócitos em ratos portadores de síndrome de Crigler-Najjar tipo 1<sup>36</sup>. Desde então, tem-se tentado elucidar os mecanismos pelos quais tais hepatócitos podem vir a contribuir no combate a diversas doenças hepáticas e aumentar a enxertia desses ao seu parênquima.

Atualmente, se vem utilizando técnicas baseadas na *Good Manufacturing Practice* (GMP), para evitar contaminação das células a serem transplantadas e estabelecer critérios rígidos para ter uma menor taxa de complicações<sup>13</sup>. De forma resumida, o processo de transplante se dá através da extração desses hepatócitos do doador pelo uso de técnicas de perfusão por colagenase. Esses hepatócitos podem vir a ser criopreservados, porém isso pode interferir na qualidade e, conseqüentemente, na

viabilidade e capacidade de enxertia no parênquima lesado. O transplante dessas células normalmente é feito por via intraportal, recomendando-se que sejam feitas no máximo infusões de  $30-100 \times 10^6/\text{kg}$  em uma taxa de infusão de 5-10ml para evitar complicações como hipertensão portal. O uso de imunossupressores para tal terapia não é bem descrito e detalhado, porém sabe-se que tais hepatócitos suscitam uma resposta imune no hospedeiro, o que leva a crer que o uso de imunossupressores possa ser benéfico<sup>21</sup>.

Na prática clínica, tem sido utilizado hepatócitos maduros de doadores cadáveres, porém a dificuldade de manutenção e expansão dessas células em meios de cultura, vem levando à estratégias para achar outras fontes de hepatócitos, principalmente através de modificação genética em células tronco que apresentam uma melhor taxa de renovação. Contudo, alguns obstáculos ainda impedem que sejam realizados ensaios clínicos com células semelhantes a hepatócitos em doenças parenquimatosas hepáticas até o momento. Dentre as dificuldades, destaca-se o potencial tumorigênico dessas células uma vez que estas ainda não estão em estágios completamente diferenciados, porém diversos progressos têm sido feitos em estudo *in vivo* envolvendo camundongos e outros animais com resultados promissores para que se realize estudo em humanos em um futuro próximo<sup>13</sup>.

### **3.2.2 TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS HEPÁTICAS METABÓLICAS**

O transplante de fígado surgiu como uma terapia eletiva para o estágio final de muitas doenças crônicas degenerativas e lesões hepáticas agudas graves. No entanto, esse tipo de terapia tem muitas desvantagens, sendo uma das mais significativas, a escassez de órgãos e a longa lista de espera em um contexto de uma doença progressiva de alta mortalidade (IBARS et al., 2016). Outra alternativa é a terapia celular, na verdade, o transplante de hepatócitos é uma terapia promissora que já foi avaliada em muitas doenças como a síndrome de Crigler-Najjar e diversas doenças metabólicas. Além disso, busca-se avaliar o uso de células tronco como uma nova terapia para doenças crônicas degenerativas hepáticas e insultos agudos que cursam com alta mortalidade e restrita possibilidade terapêutica na maioria das vezes<sup>68</sup>.

Em um contexto em que o transplante hepático tem muitas limitações, o transplante de hepatócitos surge como fonte potencial de tratamento de muitas doenças

hepáticas, tais como: doenças hepáticas metabólicas (ex: Síndrome de Crigler-najjar), insuficiência hepática aguda e insuficiência hepática crônica<sup>30</sup>. A terapia de transplante de hepatócitos tem algumas vantagens, como é metabolicamente menos estressante do que o transplante de todo o órgão e tem muitas aplicações potenciais, pois podem ser utilizadas diferentes fontes de hepatócitos como: hepatócitos maduros de doadores alogênicos, hepatócitos fetais, hepatócitos xenogênicos, células semelhantes à hepatócitos derivados de células tronco e hepatócitos imortalizados, que são hepatócitos que possuem um grande antígeno T do vírus símio 40 (SV40). O principal problema com o transplante de hepatócitos maduros é a falta de doadores e o difícil processamento, preservação e expansão dessas células, uma vez que são células completamente diferenciadas e que se multiplicam mal in vitro<sup>7,11,12</sup>.

Atualmente, existem diversos estudos que mostram a eficácia do uso do transplante de hepatócitos em doenças metabólicas, principalmente em crianças com erros inatos do metabolismo metabólicos<sup>30</sup>.

Na Tabela 1(Anexo I) estão listados os resultados de diversos estudos em humanos com a utilização do transplante de hepatócitos como terapia para doenças metabólicas hepáticas. A maioria dos estudos utilizou marcadores como a escala de encefalopatia de WEST-HAVEN (Apêndice II) para graduar o estágio de encefalopatia hepática e melhora clínica. Diversos estudos utilizaram também nível de amônia sanguínea e marcadores específicos de melhora para cada doença.

### **3.2.3 TERAPIA CELULAR EM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA**

Outra aplicação incipiente é uso do transplante de hepatócitos para falência hepática aguda. Esta é causada principalmente pelo uso abusivo de acetoaminofeno, mas pode ter diversas outras causas como abuso de outras drogas e/ou infecção por vírus hepatotrópicos como HBV e HCV.

A insuficiência hepática aguda se caracteriza por uma perda extensa do parênquima hepático de forma rápida; com isso mesmo que o fígado possua capacidade regenerativa, esta é suplantada pela rápida perda do parênquima, levando a déficit de diversas funções vitais desempenhadas pelo fígado, o que pode ocasionar o óbito do paciente. O uso de hepatócitos poderá então vir a funcionar como “ponte” para um

futuro transplante hepático, retardando a urgência do procedimento ou como terapia definitiva em si.

Na tabela 2 (Anexo II) estão listados alguns estudos em humanos com o uso do transplante de hepatócitos em situações de insuficiência hepática aguda. Assim, como o uso em doenças genéticas, só tem sido feito o transplante de hepatócitos maduros, sem nenhum uso por ora de células semelhantes a hepatócitos em estudos em humano.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, machos, entre 8 e 10 semanas. Os animais utilizados nesse projeto foram mantidos no Biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, tendo alimentação e água *ad libitum*. Este estudo foi obtido à aprovação ao CEUA do Hospital São Rafael, Protocolo 001/17 (APÊNDICE D).

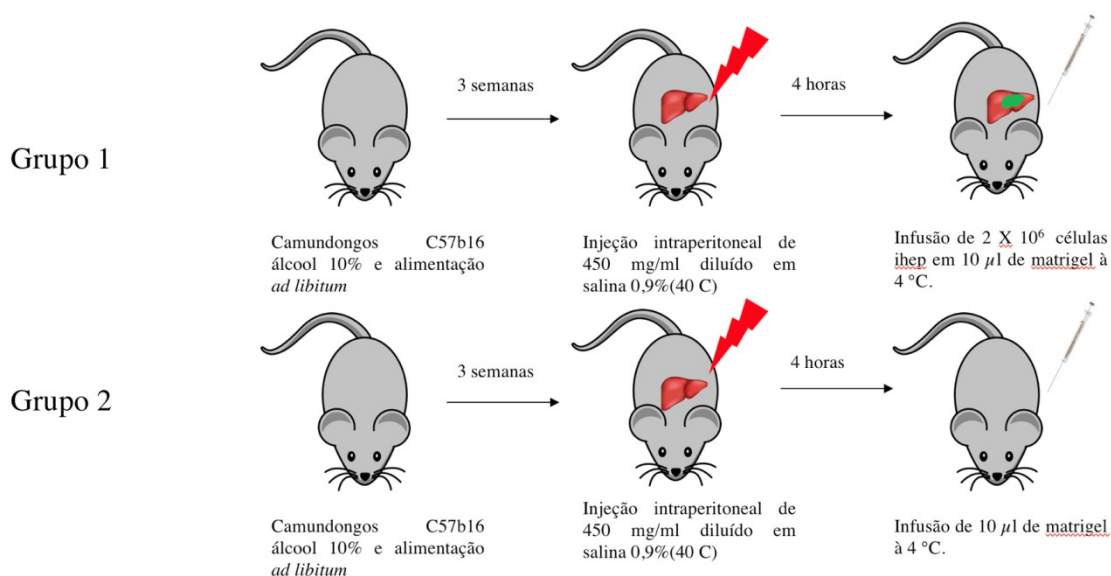
### 4.2. CULTIVO DE iHEPs

As células iHEPs foram cultivadas em placas revestidas com colágeno tipo I, em meio DMEM/F12 (Gibco; #10565018) suplementado com os seguintes fatores de crescimento recombinantes: FGF-4 (*Fibroblast Growth Factor-4*) a 10ng/mL, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) na concentração de 20ng/mL, EGF (*Epidermal Growth Factor*) na concentração de 20ng/mL, realizou-se também a suplementação com soro fetal bovino a 4%, nicotinamida a 10 $\mu$ M, dexametasona a 0,1 $\mu$ M e com o inibidor da via do TGF $\beta$  SB431542 a 1 $\mu$ M.

### 4.3 MODELO DE LESÃO HEPÁTICA E TRANSPLANTE DE iHEPs

Para indução do modelo experimental de lesão hepática aguda, camundongos C57BL/6 foram expostos durante três semanas a etanol a 10% *ad libitum* em substituição à água. Posteriormente, foram injetados 450 mg/kg de acetaminofeno, diluído em salina por via intraperitoneal, para indução de lesão hepática aguda. Quatro horas após administração do acetaminofeno, ocorreu o transplante de iHEPs (2 x10<sup>6</sup> células/camundongo), por via intra-hepática. Para o transplante das células foi utilizado o sistema HAMILTON de bomba e seringa (SIGMA-ALDRICH, 20779) de alta precisão para injeção de 1 x 10<sup>6</sup> células/minuto no lobo direito anterior do fígado. Um grupo experimental (GRUPO 1) recebeu as células ressuspendidas em Corning® Matrigel®, enquanto um outro grupo recebeu a injeção de volume equivalente de Corning® Matrigel®, porém sem células (GRUPO 2), como ilustrado na figura 4.

Durante tal processo foram analisados parâmetros bioquímicos de lesão e função hepática (ALT, AST e albumina) no sangue periférico dos animais, para correto acompanhamento.



**Figura 4:** Modelo experimental de lesão hepática aguda em camundongos c57bl/6 e transplante das iHEPs.

#### 4.4 RASTREAMENTO POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Para verificar se as células iHEPS aderiram de forma correta e se encontravam no parênquima hepático do camundongo foi realizada a eutanásia dos animais 24 horas após o implante das células, com coleta de amostras de fígado. A eutanásia foi feita sob anestesia dos camundongos com uma solução de ketamina a 90-150/7.5-16 (mg/kg) e Xilasina a 90-150/ 7.5-16(mg/kg). Os fragmentos de fígado foram fixados por 24 horas em PFA (paraformolaldeído) à 4% e, posteriormente, mais 24 horas em solução de sacarose à 30%. Os fragmentos foram, então, congelados em OCT e, posteriormente, seccionados em criostato. A integração das iHEPS foi avaliada 48 horas e 2 semanas após o transplante, através de avaliação em microscopia confocal de fragmentos do lobo hepático injetado. Para cada bloco de tecido foram realizados cortes de  $10 \mu\text{m}$  com intervalos de  $100 \mu\text{m}$  entre os cortes. Após secagem do material por 30 minutos, este foi submetido à marcação com anticorpos para imunofluorescência. Analisou-se enxertia, integração e proliferação, para tal fim foram utilizados os anticorpos anti-GFP, albumina, CD-31, fator de Von Willebrand e Ki67 (Tabela 1).

Anticorpo	Produzido	Diluição	Fabricante	Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Albumin	Coelho	1:500	DAKO	Anti-coelho 568	1:1000	Molecular Probes
GFP	Galinha	1:800	Life Technologies	Anti-galinha 488	1:500	Molecular Probes
CD31	Rato	1:100	Pharmigen	Anti-rat 568	1:500	Molecular Probes
Fator de Von willebrand	Cabra	1:100	Santa Cruz	Anti-cabra 568	1:500	Molecular Probes
Ki67	Coelho	1:200	Thermo Scientific	Anti-coelho 568	1:500	Molecular Probes

**Tabela 3:** Anticorpos utilizados para marcação de imunofluorescência.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando testes estatísticos adequados aos tipos de dados. Dados paramétricos foram avaliados pelo teste *t* de Student. Dados não-paramétricos foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Para comparação entre 3 ou mais grupos, foi utilizando o teste de ANOVA com pós-teste de Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para dados não paramétricos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$ . O método de Kaplan-Meier foi usado para cálculo da taxa de sobrevida nos dias que se seguem à administração do acetaminofeno e terapia celular.

#### 4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS, BIOÉTICAS E DEONTOLÓGICAS

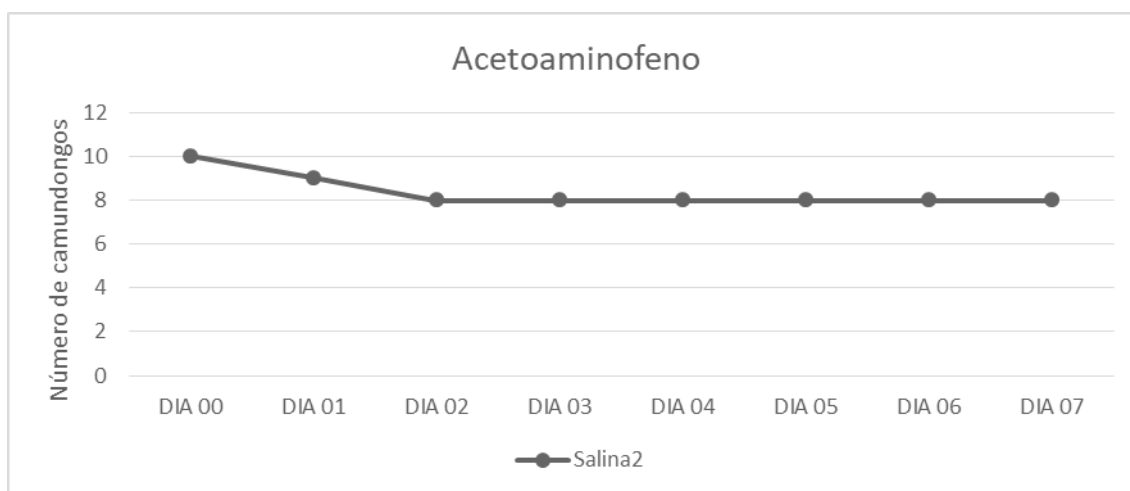
O presente estudo foi feito em camundongos da linhagem C57B6/1, mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael. A anestesia foi feita previamente, com ketamina e xilazina, 120mg/kg de peso e 5 mg/kg de peso por via intraperitoneal, respectivamente, para menor estresse dos animais e possibilitar analgesia pós-cirúrgica. O experimento consistiu em uma cirurgia por incisão simples no abdome e injeção intra-hepática de células, sem desconforto/dor que necessite a utilização de outro analgésico posteriormente. A eutanásia dos animais foi feita na semana seguinte ao experimento, utilizando uma câmara contendo CO<sub>2</sub>, causando o mínimo de desconforto possível aos mesmos. Tal estudo é um subprojeto do estudo: “Potencial terapêutico das Células-tronco mesenquimais diretamente

reprogramadas em hepatócitos em modelo de lesão hepática. ” Realizado em parceria com as pesquisadoras Iasmim Orge e Milena Botelho Soares, no Centro de Biotecnologia e Terapia celular do Hospital São Rafael sendo submetido ao CEUA do Hospital São Rafael. O comprovante de aprovação se encontra no **APÊNDICE I** do presente documento.

## 5.RESULTADOS

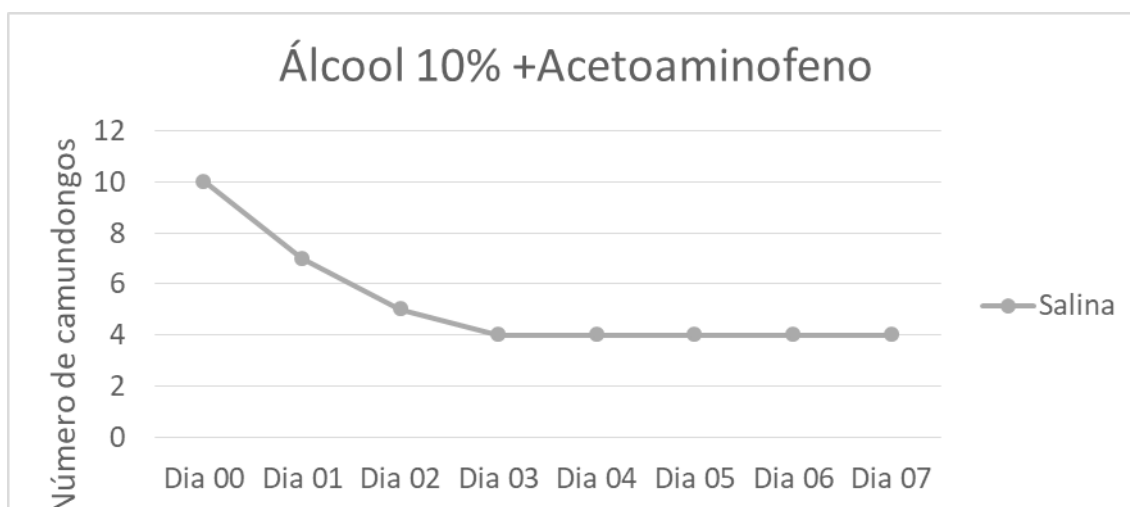
### 5.1 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE MORTALIDADE

Foram utilizados 10 animais para a infusão de 450mg/ml de acetoaminofeno diluídos em salina em 0,9% a 40° C, obtendo-se uma letalidade de 20% em 7 dias (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1:** Curva de letalidade em camundongos C57Bl/6, com dose de 450mg/kg de acetoaminofeno diluídos em salina 0,9%.

Posteriormente, foram utilizados novamente 10 animais, porém agora foi feito o uso de álcool 10% durante 3 semanas e, posteriormente, feita a infusão de 450mg/ml de acetoaminofeno diluídos em salina em 0,9% a 40° C. Observando-se uma letalidade de 60% em 7 dias (**Gráfico 2**).



**Gráfico 2:** Curva de letalidade em camundongos C57Bl/6, após 3 semanas com álcool 10% e dose de 450mg/kg de acetoaminofeno diluídos em salina 0,9%.

## 5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA LESÃO HEPÁTICA

Foram realizadas análises de parâmetros de lesão hepática (ALT e AST) e de função hepática (albumina) para estabelecimento da lesão hepática e insuficiência hepática aguda em 4 camundongos (Tabela 2).

<b>Animal</b>	<b>ALT</b> (VR = 26,3 -82,0)	<b>AST</b> (VR= 26,3 -82,0)	<b>Albumina</b> (VR= 2,6 -3,9)
<b>01</b>	<b>120,3 UI/L</b>	<b>447,4 UI/L</b>	<b>2,11 g/dl</b>
<b>02</b>	<b>113,1 UI/L</b>	<b>297,5 UI/L</b>	<b>2,14 g/dl</b>
<b>03</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>1,66 g/dl</b>
<b>04</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>1,58 g/dl</b>

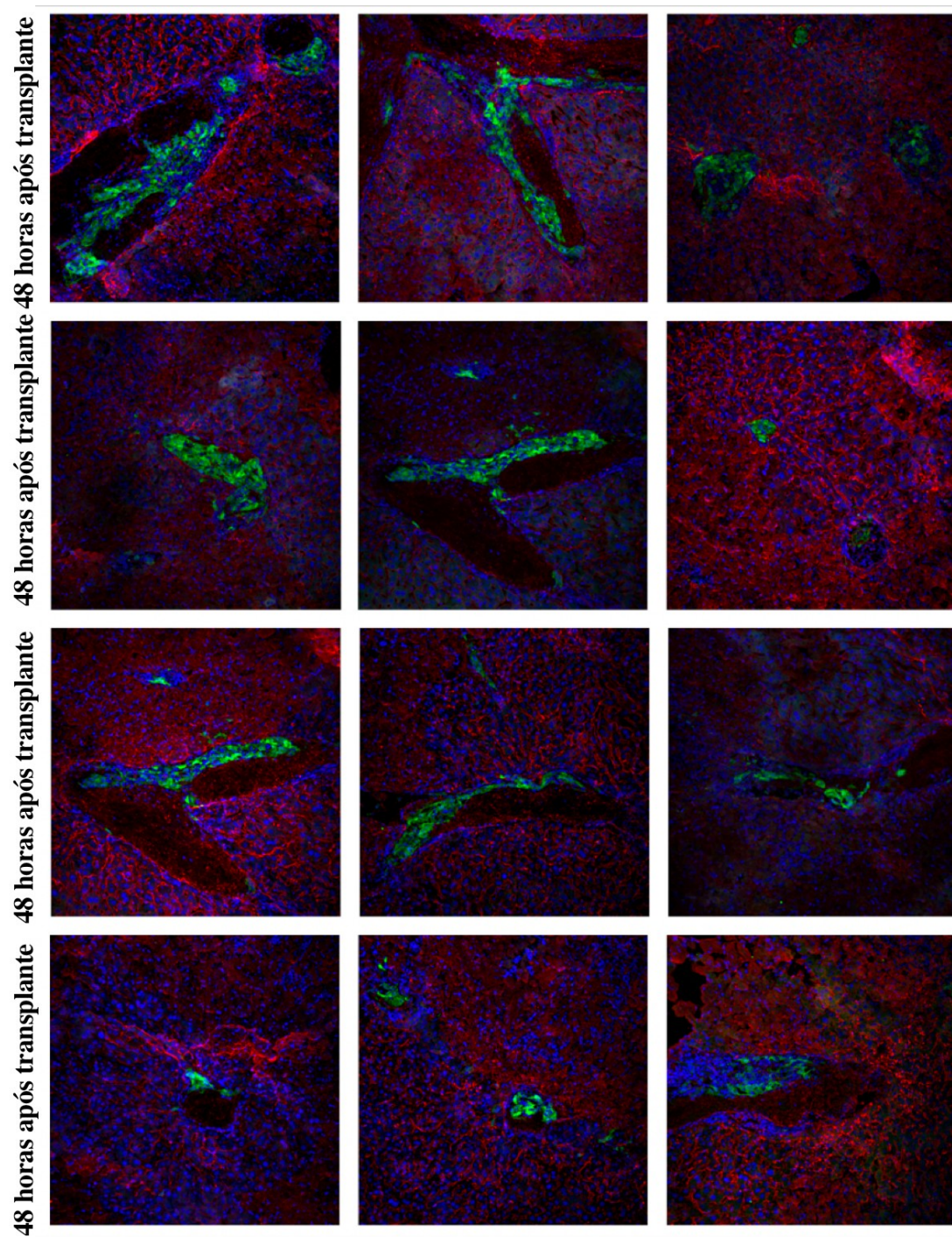
**Tabela 4:** Parâmetros de lesão hepática (ALT e AST) e de função hepática (albumina) alterados.

## 5.3 RASTREIO DAS iHEPs NO FÍGADO LESADO

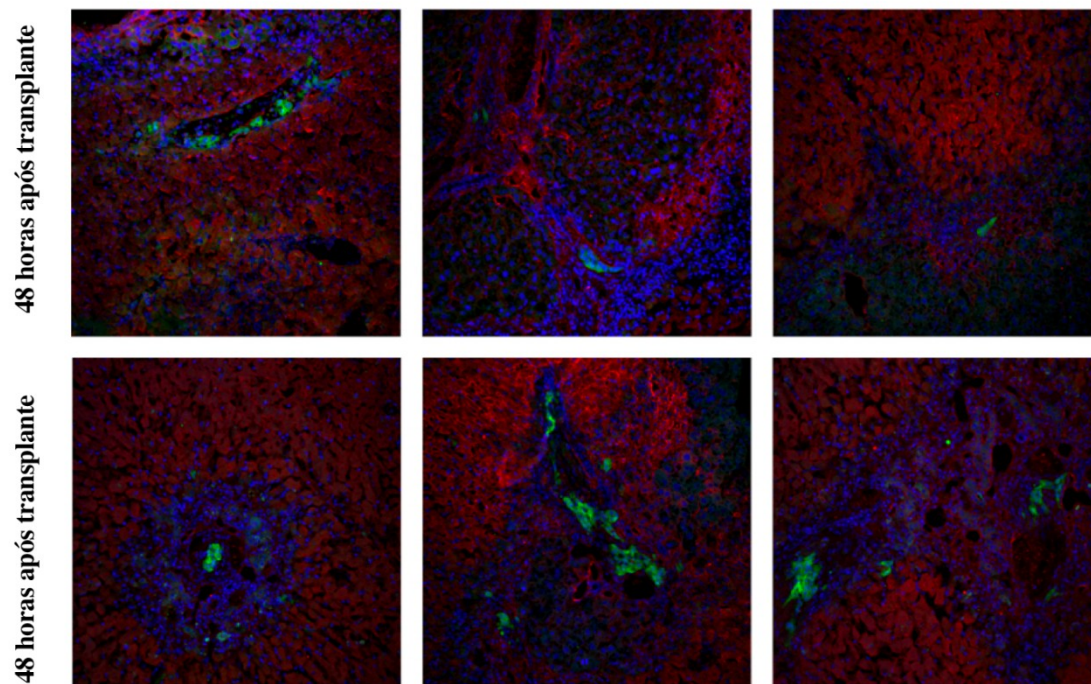
Realizou-se a imunofluorescência dos tecidos dos camundongos submetidos à lesão hepática. Os camundongos foram submetidos ao processo de lesão hepática aguda por acetaminofeno e feita a infusão de  $2 \times 10^6$  células iHEPS, como previamente descrito. Após 2 dias da infusão das células, os animais foram eutanasiados e secções de seus fígados foram analisadas por imunofluorescência. Inicialmente foram utilizados anticorpos anti-GFP e anti-albumina para constatação da presença das células nos fígados dos camundongos (Figura 2).

Após localização das células nos tecidos com 2 dias, procurou-se avaliar se tais células realmente ficariam aderidas ao tecido hepático para isso foi feita novamente a lesão hepática aguda por acetaminofeno e feita a infusão de  $2 \times 10^6$  células iHEP; porém dessa vez os animais sofreram eutanásia 2 semanas após o procedimento, analisou-se então lâminas de seus fígados que foram coradas por imunofluorescência com uso de anticorpos anti-GFP e anti-albumina (Figuras 5 e 6).

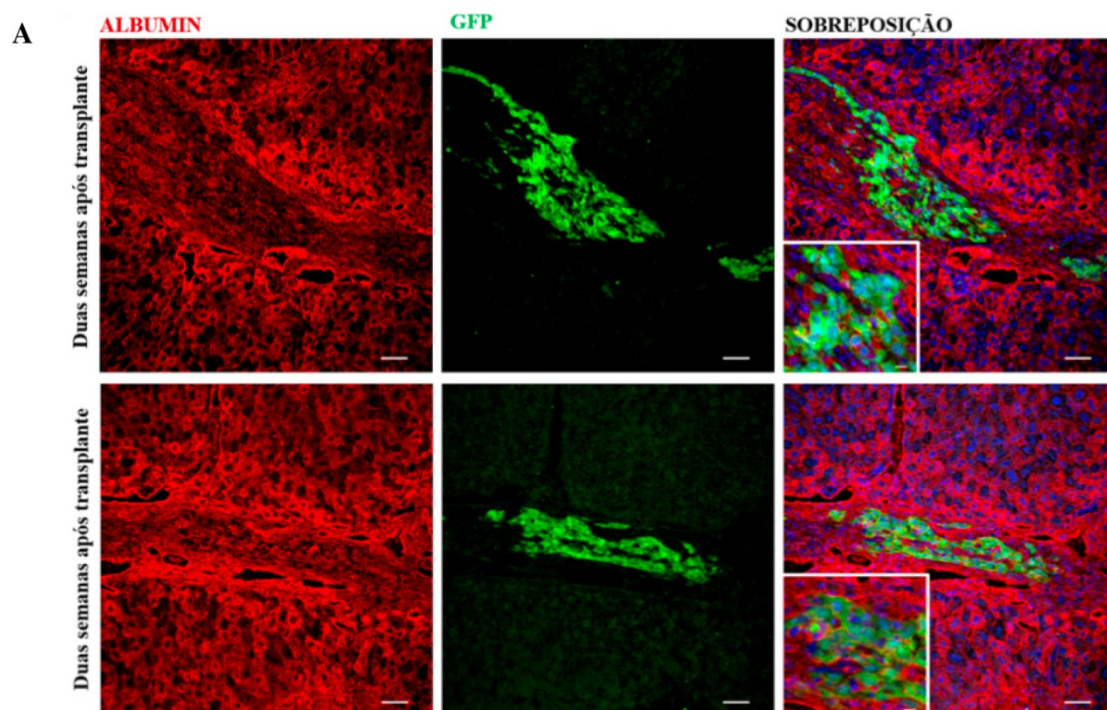
Posteriormente, foram realizadas novas análises em secções de fígado dos camundongos que sofreram eutanásia após 2 semanas da infusão das iHEP. Novamente, a técnica utilizada foi a de imunofluorescência para constatar se as células implantadas no parênquima hepático mantinham a capacidade proliferativa, utilizando os anticorpos anti-GFP e anti-Ki67, bem como se estas estavam integradas ao parênquima e não apenas no espaço porta. Para isso se utilizou anticorpos anti-fator de von Willebrand e anti-CD31 (marcadores endoteliais) para delimitar os sinusoides e constatar que as células implantadas estavam mesmo no parênquima e não na luz sinusoidal (Figura 7).

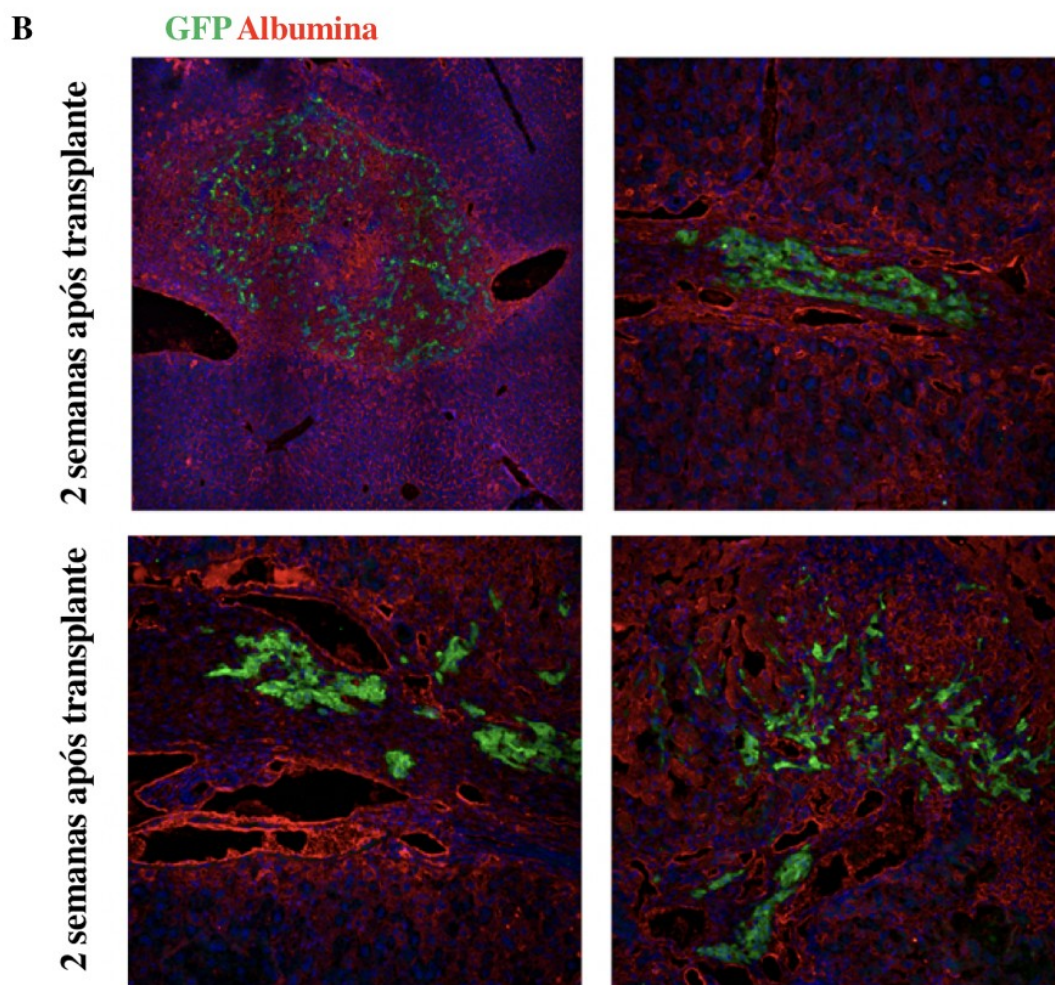
**GFP Albumina**



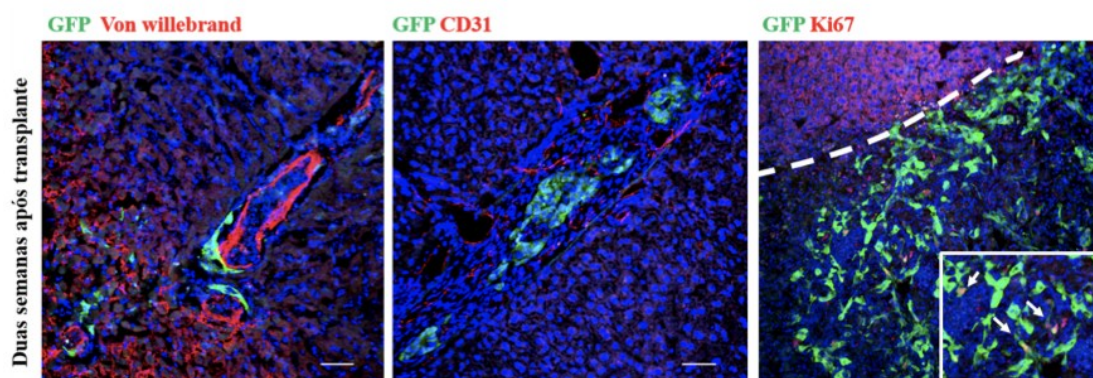


**Figura 5:** Rastreamento das iHeps no parênquima hepático dos camundongos, analisados 48 horas após infusão das células. Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-GFP (verde) e anti-albumina (vermelho) e DAPI (azul).





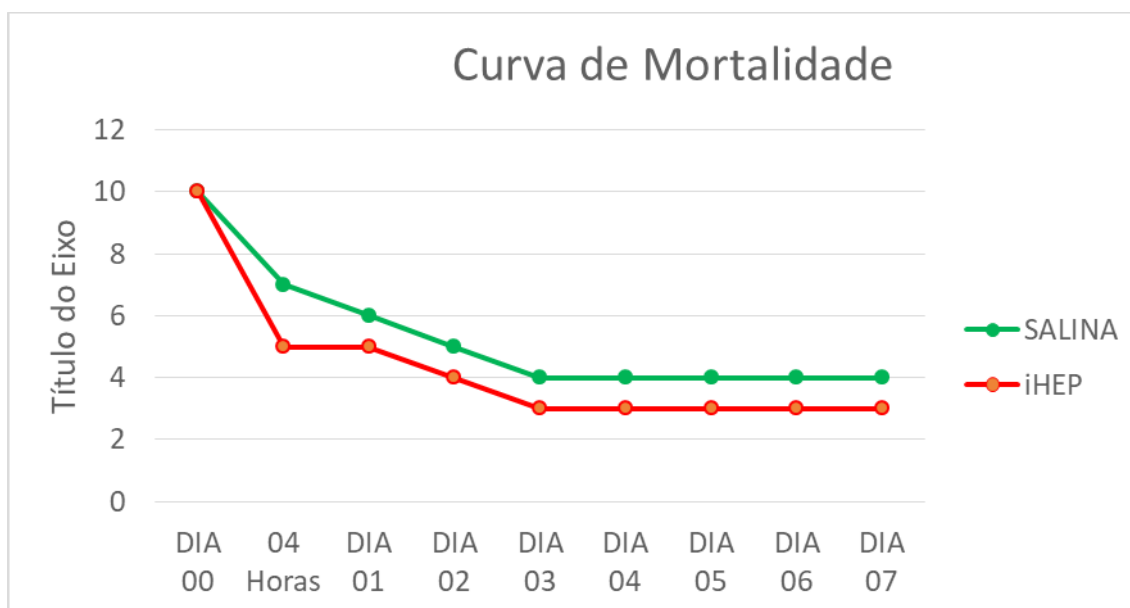
**Figura 6:** A e B; Análise da integração das iHEPs no parênquima hepático após 2 semanas. Imunofluorescência utilizando anticorpos anti-GFP (verde) e anti-albumina (vermelho) e DAPI (azul).



**Figura 7:** Análise de enxertia das iHEPs ao parênquima e sua capacidade replicativa. Imunofluorescência com marcação do GFP em verde e fator de von Willebrand e CD31 em vermelho, demonstrando integração ao parênquima hepático; e dupla marcação com GFP em verde e Ki67, marcador de proliferação celular, em vermelho.

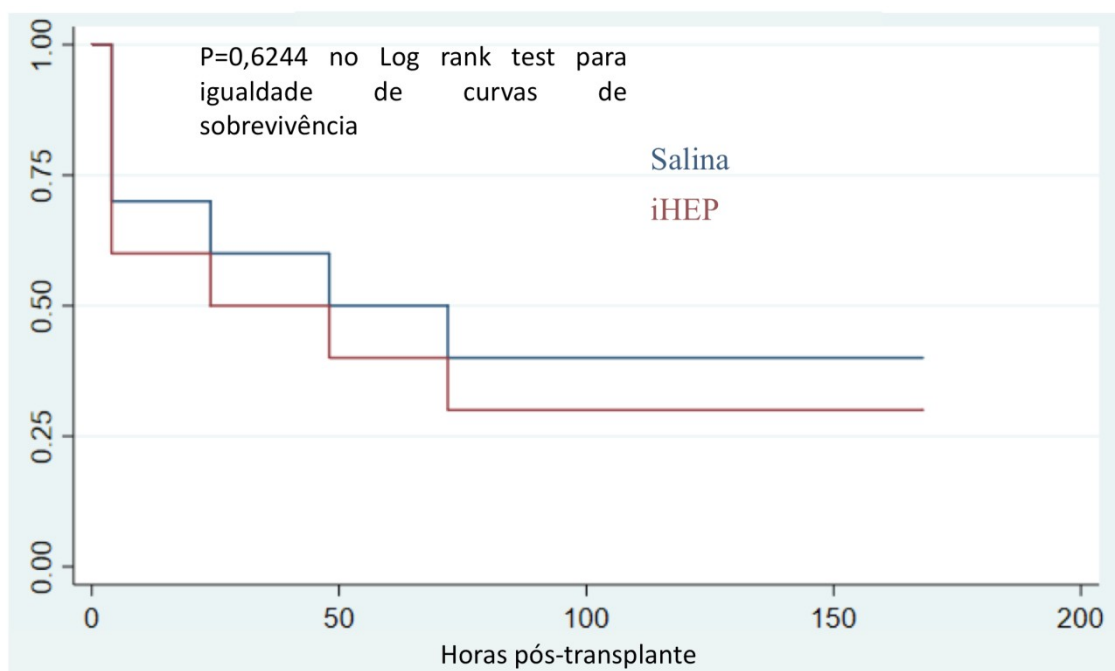
#### 5.4 IMPACTO DA TERAPIA CELULAR NA MORTALIDADE

Foram utilizados 20 animais, sendo que todos foram submetidos ao uso contínuo de álcool 10% durante 3 semanas a infusão de 450mg/ml de acetaminofeno diluídos em salina em 0,9% a 40° C. Posteriormente, realizou-se em um grupo experimental a infusão de salina, enquanto o outro grupo recebeu a infusão de  $2 \times 10^6$  células *iHEPs*, como previamente descrito. A curva de mortalidade pode ser vista no gráfico 3.



**Gráfico 3:** Impacto da terapia celular X salina (placebo) sobre a mortalidade no modelo de insuficiência hepática aguda previamente estabelecidos.

A curva de Kaplan-Meier mostrada na figura 8 demonstra a análise de sobrevivência acumulada, sendo realizado um *Log rank test* para assunção de igualdade entre as curvas que obteve um *p* valor de 0.624, demonstrando que não houve diferença significativa entre os tratamentos e acatando a hipótese nula de que ambas os tratamentos têm o mesmo efeito.



**Figura 8: Curva de Kaplan-Meier para sobrevida acumulada, comparando grupos salina e iHEP. P=0.6244**

## 6. DISCUSSÃO

O acetoaminofeno é uma droga hepatotóxica que pode levar a insuficiência hepática aguda; seu mecanismo de lesão se deve aos metabólitos da droga produzidos no fígado, pelo sistema CYP<sup>56</sup>. Por causa desse mecanismo de lesão foi feita a indução das enzimas do componente CYP hepático pelo uso crônico de álcool. Desta forma aumentou-se o número de metabólitos produzidos e com isso a criação de um modelo de sobrevida com uma curva de letalidade de 60% como demonstradas no gráfico 2. Com base nisso foi criado um modelo no qual se usou álcool a 10 % durante 3 semanas e o uso de 450mg/kg de acetoaminofeno para obtenção da insuficiência hepática aguda e da curva de mortalidade, modelo semelhante ao descrito na literatura <sup>31</sup>.

Foram achados parâmetros de albumina, ALT, AST e bilirrubina compatíveis com os de lesão e insuficiência hepática aguda, descritos na tabela 2, tais dados são semelhantes a literatura, na qual se pode notar aumento das enzimas hepáticas no soro sanguíneo (ALT e AST) com concomitante decréscimo da albumina sanguínea <sup>56</sup>.

As células injetadas foram rastreadas no parênquima hepático após 48 horas, dados compatíveis com a literatura atual, na qual se demonstra adesão de células semelhantes à hepatócitos, sejam estes gerados por reprogramação direta através de células mesenquimais como este modelo ou através de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) <sup>26,55</sup>. Essa informação leva a ideia de que tais células possam a vir ter um papel nas primeiras 48 horas da lesão hepática, possivelmente funcionando como uma tentativa de resgate e ajuda na regeneração do parênquima hepático de forma rápida. Uma vez que essa fase inicial da lesão hepática aguda (48 horas) possui grande letalidade é importantíssimo o uso de terapias que possam parar ou retardar o avanço da doença<sup>57</sup>.

Os achados de integração após 2 semanas também são compatíveis com alguns estudos da literatura atual e reforçam a possibilidade de a terapia celular poder impactar na sobrevida e terapêutica da lesão hepática aguda <sup>27,55</sup>. Foram analisados aspectos ainda como o Ki67 e CD31 para comprovar tanto a manutenção da capacidade proliferativa das células como de enxertia a esse parênquima. Tais dados reforçam a hipótese de que tais células podem ajudar na regeneração do parênquima hepático, uma vez que foi

evidenciado que as mesmas integram a este e ao mesmo tempo possuem capacidade proliferativa, portanto podem repovoar o fígado lesado.

Quando analisada a curva de sobrevivência, podemos ver que não houve diferença estatisticamente significativa no aspecto que tange a mortalidade em 07 dias. Tal fato pode ser explicado pelos outros mecanismos extra-hepáticos de lesão, como por exemplo, a nefrotoxicidade que ocorre comumente em intoxicações pelo acetoaminofeno, podendo ocorrer insuficiência renal em até 2% dos casos<sup>17</sup>; além disso aspectos decorrentes do trauma cirúrgico e da sua resposta imunometabólica podem explicar a elevada mortalidade nas primeiras 04 horas de vida, podendo influir no resultado final da curva de mortalidade e sobrevivência<sup>74</sup>.

O tempo estabelecido para a infusão das células foi de 4 horas após o uso do acetoaminofeno. A meia vida do acetoaminofeno em camundongos varia de 1-2 horas em doses terapêuticas, porém em situações de overdose essa meia vida pode ser aumentada. Além disso, os metabólitos tóxicos com NAPQI começam a aumentar com cerca de 3-4 horas, concomitantemente a queda da glutatona<sup>17</sup>. Com esse dado, pode-se inferir que o tempo de infusão das células talvez não tenha sido o mais otimizado possível; requerendo assim a análise de tempos diferentes de infusão para afirmarmos que tal terapia celular não promoveu melhora.

Podemos concluir com esses dados que as células geradas possuem a capacidade de enxertia, adesão e proliferativa no parênquima hepático. Será realizado estudo em outro modelo de lesão hepática através da administração de tetracloreto de carbono (CCL4) com menor influência de covariáveis como a nefrotoxicidade a fim de identificar o real potencial da terapia celular com células semelhantes à hepatócitos na mortalidade da insuficiência hepática aguda e não acarretar em um erro tipo II.

## 7. CONCLUSÕES

As células demonstraram capacidade de enxertia e proliferação no modelo de insuficiência hepática aguda por acetoaminofeno.

Não foi possível estabelecer um impacto na sobrevida desses camundongos, nesse modelo experimental.

## 8. SUMMARY

**Introduction:** The high prevalence of hepatopathies in the general population has led to the constant search for new therapeutic alternatives, aimed at the treatment and / or cure of such diseases. Currently, the use of cell therapy from mesenchymal stem cells has been growing more and more as a viable alternative. Since one can use cells of the own carrier of the disease, bypassing problems like rejection by the immune system. However, several problems still need to be overcome: acquisition of large numbers of viable cells for use in cell therapy and a greater adhesion of these cells to the injured organ. The present study aims to establish the effectiveness of cell therapy promoted by hepatocytes derived from mesenchymal stem cells (iHeps) as a therapeutic alternative in an experimental model of acute hepatic failure induced by acetoaminophen in C57B1 / 6 mice. **Method:** C57B1 / 6 mice were used for three weeks using 10% ethanol ad libitum instead of water. Subsequently, 450 mg / kg of acetoaminophen, diluted in saline intraperitoneally, was injected for induction of acute liver injury. Four hours after administration of acetoaminophen, iHEPs (2,106 cells / mouse) were transplanted intrahepatically. Immunofluorescence was used for cell screening and proliferation verification in the hepatic parenchyma (48 hours and 2 weeks after transplantation). Survival analysis was performed for seven days. **Results:** The mortality curve proposed in the model was established with 10% ethanol for 3 weeks and injection of 450mg / kg of acetoaminophen; by immunofluorescence it was possible to demonstrate transdifferentiated hepatocytes adhered and proliferating in the hepatic parenchyma. Survival analysis did not show a statistically significant difference in mortality in the Kaplan-meier model for survival. **Conclusion:** The cells demonstrated the capacity of grafting and proliferation in the model of acetoamphrine acute liver failure. It was not possible to establish an impact on the survival of these mice in this experimental model.

Keywords: 1. Celular therapy. 2.Hepatic reprogramation 3. Hepatocyte 4.Pathology 5.Immunofluorescence

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Abubakar I, Tillmann A. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* .385.9963 (2015): 117-171.
2. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, Caenazzo L, Basso S, Carraro P, Valente ML, D'amico D. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type 1. *Cell transplantation*. 2005 Feb;14(2-3):151-7.
3. Beck BB, Habbig S, Dittrich K, Stippel D, Kaul I, Koerber F, Goebel H, Salido EC, Kemper M, Meyburg J, Hoppe B. Liver cell transplantation in severe infantile oxalosis—a potential bridging procedure to orthotopic liver transplantation?. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012 Jan 28;27(7):2984-9.
4. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *The Lancet*. 2010 Jul 17;376(9736):190-201.
5. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transplantation*. 2000 Jan 1;6(1):32-40.
6. Biolato M, Araneo C, Marrone G, Liguori A, Miele L, Ponziani FR, Gasbarrini A, Grieco A. Liver transplantation for drug-induced acute liver failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar 1;21(1 Suppl):37-45.
7. Bohnen NI, Charron M, Reyes J, Rubinstein W, Strom SC, Swanson D, Towbin R. Use of Indium-111–Labeled Hepatocytes to Determine the Biodistribution of Transplanted Hepatocytes Through Portal Vein Infusion. *Clinical nuclear medicine*. 2000 Jun 1;25(6):447-50.
8. Burtscher, I., & Lickert, H. (2009). Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development*, 136(6), 1029-1038.
9. Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*, 7(6), 259-264.
10. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research*. 2015; 2015:394917. doi:10.1155/2015/394917.
11. Darwish AA, Sokal E, Stephenne X, Najimi M, de Goyet JD, Reding R. Permanent access to the portal system for cellular transplantation using an implantable port device. *Liver transplantation*. 2004 Sep;10(9):1213-5.

12. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Verma A, Heaton ND, Rela M. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004 Dec 27;78(12):1812-4.
13. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010 May;7(5):288.
14. Dominici ML, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 Jan 1;8(4):315-7.
15. Dong XJ, Zhang H, Pan RL, Xiang LX, Shao JZ. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2010 Jul 14;16(26):3267.
16. Enosawa S, Horikawa R, Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y. Hepatocyte transplantation using a living donor reduced graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source of hepatocytes. *Liver Transplantation*. 2014 Mar;20(3):391-3.
17. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1981 Nov 1;219(2):281-6.
18. Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, Posner M, Strom S. Defining Hepatocellular Chimerism In A Liver Failure Patient Bridged With Hepatocyte Infusion 1. *Transplantation*. 2000 Jan 27;69(2):303.
19. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: Biology and therapy. In *The Hepatocyte Review 2000* (pp. 475-501). Springer, Dordrecht.
20. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006 Aug 27;82(4):441-9.
21. Fisher RA, Bu D, Thompson M, Wolfe L, Ritter JK. Optimization of conditions for clinical human hepatocyte infusion. *Cell transplantation*. 2004 Jan 1;13(6):677-.
22. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler–Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1998 May 14;338(20):1422-7.
23. Fox IJ, Chowdhury NR, Gupta S, Kondapalli R, Schilsky ML, Stockert RJ, Chowdhury JR. Conditional immortalization of Gunn rat hepatocytes: an ex vivo

- model for evaluating methods for bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene transfer. *Hepatology*. 1995 Mar;21(3):837-46.
24. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*. 1994 Oct 27;58(8):951-2.
  25. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2004 May 27;77(10):1481-6.
  26. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics*. 2003 Jun 1;111(6):1262-7.
  27. Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *nature*. 2011 Jul;475(7356):386.
  28. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, Heaton ND, Muiesan P. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver transplantation*. 2006 May;12(5):713-7.
  29. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2005 Aug;98(8):341-5.
  30. Ibars EP, Cortes M, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Castell JV, Mir J. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. *World journal of gastroenterology*. 2016 Jan 14;22(2):874.
  31. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2014 Sep;2(3):153.
  32. Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao P, Pande G, Narasu ML, Khaja MN, Pramila R. Treatment of Crigler-Najjar Syndrome type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: a simple procedure for management of hyperbilirubinemia. In *Transplantation proceedings* 2008 May 1 (Vol. 40, No. 4, pp. 1148-1150). Elsevier.
  33. Khan AA, Shaik MV, Parveen N, Rajendraprasad A, Aleem MA, Habeeb MA, Srinivas G, Raj TA, Tiwari SK, Kumaresan K, Venkateswarlu J. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis. *Cell transplantation*. 2010 Apr 1;19(4):409-18.

34. Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, Kim JW, Park HY, Lee SY, Lee HH, Park JW. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. Cell transplantation. 2007 Jun 1;16(6):629-37.
35. Lee WM, Stravitz RT, Larson AM. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. Hepatology. 2012 Mar;55(3):965-7.
36. Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. Liver transplantation. 2008 May;14(5):688-94.
37. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. Science. 1976 May 28;192(4242):892-4.
38. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, Schmidt J, Ott M, Pettenazzo A, Luecke T, Bertram H. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. Transplantation. 2009 Mar 15;87(5):636-41.
39. Meyburg J, Hoerster F, Schmidt J, Poeschl J, Hoffmann GF, Schenk JP. Monitoring of intraportal liver cell application in children. Cell transplantation. 2010 May 1;19(5):629-38.
40. Meyburg J, Alexandrova K, Barthold M, Kafert-Kasting S, Schneider AS, Attaran M, Hoerster F, Schmidt J, Hoffmann GF, Ott M. Liver cell transplantation: basic investigations for safe application in infants and small children. Cell transplantation. 2009 Jul 1;18(7):777-86.
41. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. Transplantation. 2004 May 27;77(10):1614-6.
42. Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, Murray CJ, Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. BMC medicine. 2014 Dec;12(1):145.
43. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. The Lancet. 2002 Jan 26;359(9303):317-8.
44. Nader, L. Impacto das Doencas Hepaticas nas Internacoes Hospitalares e na Mortalidade do Sistema Unico de Saude do Brasil no Periodo de 2001 a 2010. 2012.

- Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade federal de ciências da saúde de Porto Alegre, Porto Alegre.2012
45. Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *The Journal of cell biology*. 1994 Jul 1;126(1):223-33.
  46. Nardi Nance Beyer, Teixeira Leonardo Augusto Karam, Silva Eduardo Filipe Ávila da. *Terapia gênica. Ciênc. saúde coletiva* [Internet]. 2002.
  47. Ogoke O, Oluwole J, Parashurama N. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine. *Journal of biological engineering*. 2017 Dec;11(1):46.
  48. Ott M, Barthold M, Alexandrova K, Griesel C, Schneider A, Attaran M, Arsenieva M, Penkov B, Net M, Peralta V, Bredehorn T. Clinical application of human hepatocytes isolated under CGMP conditions. In *JOURNAL OF HEPATOLOGY* 2005 Apr 1 (Vol. 42, pp. 261-261). PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS: ELSEVIER SCIENCE BV.
  49. Pauwelyn K, Roelandt P, Notelaers T, Sancho-Bru P, Fevery J, Verfaillie CM. Culture of mouse embryonic stem cells with serum but without exogenous growth factors is sufficient to generate functional hepatocyte-like cells. *PloS one*. 2011 Aug 2;6(8):e23096.
  50. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
  51. Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, Karani J, Champion MP, Heaton N, Mohamed R, Dhawan A. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation—a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *American Journal of Transplantation*. 2008 Feb;8(2):452-7.
  52. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995 May 23;92(11):4942-6.
  53. Ribes-Koninckx C, Ibars EP, Agrasot MÁ, Bonora-Centelles A, Miquel BP, Vila Carbó JJ, Aliaga ED, Pallardó JM, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell transplantation*. 2012 Oct 1;21(10):2267-82.
  54. Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on January 14, 2018.)

55. Goldman L, Schafer A. Goldman-Cecil Medicine..
56. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*. 2011 Jul;475(7356):390.
57. Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, Rumack BH. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. *New England Journal of Medicine*. 1988 Dec 15;319(24):1557-62.
58. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Otte JB, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation*. 2003 Aug 27;76(4):735-8.
59. Soriano HE, Wood RP, Kang DC, Ozaki CF, Finegold MJ, Bischoff FC, Reid BS, Ferry GD. Hepatocellular transplantation (HCT) in children with fulminant liver failure (FLF). In *Hepatology* 1997 Oct 1 (Vol. 26, No. 4, pp. 443-443). INDEPENDENCE SQUARE WEST CURTIS CENTER, STE 300, PHILADELPHIA, PA 19106-3399: WB SAUNDERS CO.
60. Stéphane X, Debray FG, Smets F, Jazouli N, Sana G, Tondreau T, Menten R, Goffette P, Boemer F, Schoos R, Gersting SW. Hepatocyte transplantation using the domino concept in a child with tetrabiopterin nonresponsive phenylketonuria. *Cell transplantation*. 2012 Dec;21(12):2765-70.
61. Stéphane X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology*. 2006 Apr 1;130(4):1317-23.
62. Stéphane X, Najimi M, Smets F, Reding R, De Goyet JD, Sokal EM. Cryopreserved liver cell transplantation controls ornithine transcarbamylase deficient patient while awaiting liver transplantation. *American journal of transplantation*. 2005 Aug;5(8):2058-61.
63. Sterling RK, Fisher RA. Liver transplantation: living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clinics in liver disease*. 2001 May 1;5(2):431-60.
64. Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19(1):39-48.
65. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, Miele L, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT, Reyes J. Transplantation of human hepatocytes. In *Transplantation proceedings* 1997 Jun 1 (Vol. 29, No. 4, pp. 2103-2106). Elsevier.
66. Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis*. 1999;19(1):39-48.

67. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
68. Takemoto N, Suehara T, Frisco HL, Sato SI, Sezaki T, Kusamori K, Kawazoe Y, Park SM, Yamazoe S, Mizuhata Y, Inoue R. Small-molecule-induced clustering of heparan sulfate promotes cell adhesion. *Journal of the American Chemical Society*. 2013 Jul 17;135(30):11032-9.
69. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
70. Vogel KR, Kennedy AA, Whitehouse LA, Gibson KM. Therapeutic hepatocyte transplant for inherited metabolic disorders: functional considerations, recent outcomes and future prospects. *Journal of inherited metabolic disease*. 2014 Mar 1;37(2):165-76.
71. Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology*. 2003 Jun;37(6):1249-53.
72. World Health Organization. *World Health Statistics 2017: Monitoring Health for The SDGs*. World Health Organization. 2017. 103 p.
73. Yamazoe S, Shimogawa H, Sato SI, Esko JD, Uesugi M. A dumbbell-shaped small molecule that promotes cell adhesion and growth. *Chemistry & biology*. 2009 Jul 31;16(7):773-82.
74. Lord JM, Midwinter MJ, Chen YF, Belli A, Brohi K, Kovacs EJ, Koenderman L, Kubes P, Lilford RJ. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet*. 2014 Oct 18;384(9952):1455-65.

## 10. ANEXOS

## ANEXO I

Artigo	Doença	Metodologia/ Idade	Número de células/ Via injetada	Acompanhamento/ Resultados
Strom et al.; Horslen, Fox et al.	Deficiência de 1-alpha AT.	Relato de caso/ 18 semanas de idade.	Infusão intraportal de células maduras.	Ao explante do fígado mostrou cirrose; tratado com transplante ortotópico 2 dias após transplante de células.
Fox et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Relato de caso/ 10 anos de idade.	3 infusões por 24 horas de $7,5 \times 10^9$ hepatócitos por via intraportal.	Bilirrubina total reduziu 50% e glicurinedeo bilirrubina foi demonstrada na bile por 3 anos e 6 meses. Após 4 anos foi submetido ao transplante hepático.
Hughes et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 3 anos e 6 meses de idade.	9 infusões durante 2 semanas e uma após 3 meses totalizando um total de $4.3 \times 10^9$ hepatócitos por via intraportal.	Bilirrubina total estava reduzida 40 % em 9 meses após transplante de hepatócitos.



Ambrosino et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Relato de caso/ 9 anos de idade.	Infusão intraportal de $4 \times 10^9$ hepatócitos.	Bilirrubina total foi reduzida em 50% ;4,6 meses após o procedimento, paciente foi submetido a transplante ortotópico do fígado.
Allen K et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Relato de caso/ 8 anos de idade.	Infusão intraportal de $1.5 \times 10^9$ hepatócitos.	Bilirrubina total foi reduzida em 30 %. Paciente foi submetido a transplante ortotópico do fígado em 11 meses.
Darwish AA et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 8 anos de idade.	Uma infusão percutânea, associada a 8 infusões através de um cateter mesentérico-portal implantado (mesenteric port-a-Cath) durante 5 meses	Bilirrubina foi reduzida em 40 %. Paciente foi submetida a transplante ortotópico hepático após 20 meses.
Dhawan et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 18 meses de idade.	Infusão de $4.3 \times 10^9$ hepatócitos por via intraportal.	Decréscimo de 40% na bilirrubina durante 6 meses. Transplante ortotópico hepático após 8 meses.
Dhawan et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 42 meses de idade.	Infusão de $2.1 \times 10^9$ hepatócitos por via intraportal.	Sem benefício claro/ NA.
Khan et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Relato de caso/ 2 anos de idade.	Infusão de $1.5 \times 10^7$ células progenitoras hepáticas na artéria hepática.	Bilirrubina foi reduzida em 50 % /NA.
Meyburg et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 11 anos de idade.	Infusão de $7.2 \times 10^9$ hepatócitos por via intraportal.	Bilirrubina foi reduzida em 20%. Paciente esperando um transplante ortotópico

hepático.

Ribes-konickx et al.	Síndrome de Crigler-Najjar tipo 1.	Série de casos/ 7 anos de idade.	Infusão de 6.7 X 10 <sup>9</sup> hepatócitos por via intraportal.	Bilirrubina foi reduzida em 50 % e permaneceu estável por 1 ano; melhora dos parâmetros psicomotores.
Dhawan et al.	Deficiência de fator VII.	Série de casos/ 35 meses de idade.	Infusão intraportal de 2.18X 10 <sup>9</sup> de hepatócitos.	Decréscimo da necessidade de rFVII em 70%. Após 8 meses transplante ortotópico hepático.
Dhawan et al.	Deficiência de fator VII.	Série de casos/ 3 meses de idade.	Infusão intraportal de 1.09 X 10 <sup>9</sup> de hepatócitos.	Decréscimo da necessidade de rFVII em 70%. Após 7 meses transplante ortotópico hepático.
Hughes et al.	Deficiência de fator VII.	Série de casos/ 4 meses de idade	Infusão intraportal de 5.0 X 10 <sup>8</sup> de hepatócitos.	Decréscimo da necessidade de rFVII / NA.
Ribes-konickx et al.	Doença de depósito de glicogênio tipo 1a.	Série de casos/ 6 anos de idade	Infusão intraportal de 2.35 X 10 <sup>9</sup> de hepatócitos.	Diminuição da ocorrência de episódios de hipoglicemia; após 1 ano, ainda permanece sem admissões hospitalares por hipoglicemia.
Muraca et al.	Doença de depósito de glicogênio tipo 1a.	Relato de caso / 47 anos de idade	Infusão intraportal de 2 X 10 <sup>9</sup> de hepatócitos.	Durante 9 meses não foi constatado nenhum episódio hiperglicêmico. N/A

Lee et al.	Doença de depósito de glicogênio tipo 1b.	Relato de caso /18 anos de idade.	3 infusões de hepatócitos por via intraportal (primeira :2 X 10 <sup>9</sup> ; segunda: 1 x10 <sup>9</sup> ; terceira: 3x 10 <sup>9</sup> células).	Atividade da glucose-6-phosphatase normalizada durante 7 meses. N/A
Sokal et al.	Doença de Refsum infantil.	Relato de caso/ 4 anos de idade.	Infusão intraportal de 2 X 10 <sup>9</sup> hepatócitos.	Decréscimo de 40% no ácido pipercolico e a relação C26:c22 de ácido graxo diminui em 36% em 18 meses. N/A
Stephenne et al.	Fenilcetonúria.	Relato de caso/ 6 anos de idade.	2 infusões Intraportais (Primeira:6.3 X 10 <sup>8</sup> ; segunda :1.1 X 10 <sup>9</sup> ).	Por 3 meses os níveis de fenilalanina foram normalizados, após esse período o paciente necessitou retornar à dieta com restrição de fenilalanina.
Beck et al.	Hiperoxalúria tipo 1.	Relato de caso/ 33 meses de idade.	Infusão por via intraportal de 0.3 X 10 <sup>9</sup> hepatócitos (Infusões diárias durante 6 dias).	Decréscimo nos níveis de oxalato variando de 25-33%; Transplante renal e ortotópico hepáticos após 4 meses.
Hughes et al.; Dhawan et al.	Colestase progressiva intrahepática familiar.	Série de casos/ 32 meses de idade.	Infusão intraportal de 3 X 10 <sup>8</sup> hepatócitos.	Sem benefício. Transplante ortotópico hepático após 5 meses.
Hughes et al.; Dhawan et al.	Colestase progressiva intra-hepática familiar tipo 2.	Série de casos/ 16 meses de idade.	Infusão intra portal de 3 X 10 <sup>8</sup> de hepatócitos.	Sem benefício. Transplante ortotópico hepático após 14 meses.

Ribes-konickx et al.	Tirosenemia tipo 1.		Série de casos/ 45 dias de idade.	Infusão intra portal de $0.66 \times 10^9$ de hepatócitos.	Decréscimo no nível de bilirrubina e melhora da coagulação. Transplante hepático ortotópico em 45 dias.
Strom et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 5 anos de idade.	Infusão intraportal de aproximadamente $1 \times 10^9$ hepatócitos em 2 sessões.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea. Paciente faleceu em decorrência de sepse após 42 dias.
Horslen et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Relato de caso/ 10 horas de nascido.	Aproximadamente $4 \times 10^9$ hepatócitos foram infundidos através de um cateter pela veia umbilical posicionado na veia porta durante 3 semanas e meia.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea. Aumentada a tolerância a proteína. Transplante ortotópico hepático após 6 meses.
Mitry et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Relato de caso/ recém-nascido.	Infusão de $7.3 \times 10^8$ de hepatócitos pela via umbilical.	Normalizado nível sanguíneo de amônia e não desenvolveu nenhum distúrbio neurológico; realizado transplante ortotópico hepático após 7 meses,
Darwish et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 14 meses de idade.	Falha no posicionamento do cateter.	Não foram reportados dados do transplante pois falhou durante o posicionamento do cateter. Transplante ortotópico hepático após 6 meses.
Stephenne et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 14 meses de idade.	Infusão intraportal de $0.24 \times 10^9$ hepatócitos.	Decréscimo na amônia sanguínea e melhora na produção de ureia; não desenvolveu nenhum

distúrbio neurológico  
transplante ortotópico  
hepático após 6 meses.

Puppi et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Relato de caso / 1 dia de idade.	Infusão intraportal de $1.74 \times 10^9$ hepatócitos por 6 meses.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. Transplante hepático auxiliar em 7 meses.
Meyburg et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 6 horas após o nascimento.	Infusão de $0.94 \times 10^9$ de hepatócitos via veia umbilical.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. Normalização na excreta de ácido úrico. Faleceu 4 dias após o transplante de hepatócitos.
Meyburg et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 9 dias de idade.	Infusão de $0.87 \times 10^9$ de hepatócitos via veia umbilical.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea. Tolerância a proteína melhorada. Excreção de ácido orotico urinário normalizada. À espera de um transplante ortotópico hepático
Bohnen et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Relato de caso/ 5 anos de idade.	Não descrito no artigo	Decréscimo nos níveis de amônia no sangue e normalização dos níveis de glutamina sanguíneos. O paciente faleceu após 45 dias do transplante.

Mitry et al.	Deficiência de transcarbamilase.	ornitina	Série de casos/ 1 dia de idade.	Não descrito no artigo.	Decréscimo nos níveis de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. Transplante hepático auxiliar após 7 meses.
Ribes-konickx et al.	Deficiência de transcarbamilase	ornitina	Série de casos/ 12 anos de idade.	2 infusões intraportais totalizando $0.87 \times 10^9$ de hepatócitos.	Decréscimo nos níveis de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. Níveis de glutamina sanguínea foram normalizados. O paciente faleceu após 30 dias do transplante de hepatócitos.
Ensawa et al.	Deficiência de transcarbamilase	ornitina	Relato de caso/ 11 dias de idade.	Duas infusões intraportais: primeira de $7.4 \times 10^7$ de hepatócitos e uma segunda infusão de $6.6 \times 10^7$ hepatócitos.	Decréscimo no nível de amônia sanguínea e não desenvolveu nenhuma anormalidade neurológica após 3 meses da infusão.
Stephenne et al.	Deficiência de succinato liase	argino	Relato de caso/ 42 meses de idade.	Três infusões intraportais de hepatócitos (primeira : $1.7 \times 10^9$ ; segunda: $1 \times 10^9$ ; terceira: $1 \times 10^9$ )	Decréscimo dos níveis de amônia sanguínea e melhora psicomotora. Transplante ortotópico hepático após 18 meses.
Darwish et al.	Deficiência de succinato liase	argino	Série de casos/ 3 anos de idade.	6 infusões pelo sistema "port-a-Cath" durante 1 mês na veia gastrocólica de hepatócitos.	Decréscimo dos níveis de amônia sanguínea. N/A
Meyburg et al.	Deficiência de fosfato sintase I.	carbamoil	Relato de caso, 2,5 meses de idade.	Não descrito no artigo.	Decréscimo nos níveis de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. À espera de um transplante

ortotópico hepático.

Meyburg et al.	Citrulinemia	Relato de caso 3 anos de idade.	Não descrito no artigo.	Decréscimo nos níveis de amônia sanguínea e melhora na produção de ureia. Melhora na tolerância a proteínas. N/A
----------------	--------------	---------------------------------	-------------------------	--

**Tabela 1:** Mostrando estudos conduzidos em humanos com doença hepática metabólica, que foram submetidos ao transplante de hepatócitos e seus resultados.

## ANEXO II

Artigo	Doença	Metodologia /Idade	Número de células/Via injetada	Acompanhamento/ Resultados
Soriano et al.	Acetoaminofeno	Série de casos/ 16 anos de idade.	Infusão intraportal de $4 \times 10^7$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguínea, sem mudança na graduação de encefalopatia (permaneceu 4). Faleceu 2 dias após o procedimento.
Fisher et al.	Acetoaminofeno	Série de casos/ 26 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1.2 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguínea, melhora do estadiamento de encefalopatia 4, feito OLT com recuperação total.

Soriano et al.	INH (Isoniazida)	Série de casos/ 12 anos de idade	Infusão intraportal de $3 \times 10^8$ células em um total de 3 infusões.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, sem mudança no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Faleceu 7 dias após o procedimento.
Soriano et al.	Fenitoína	Série de casos/ 10 de idade.	Infusão intraportal de $8.4 \times 10^9$ células em um total de 3 infusões.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, sem mudança no estadiamento grau 4 da encefalopatia. Faleceu 7 dias após por causa de uma meningite viral.
Strom et al.	Sódio de difenilidantoína (Dilantina)	Série de casos/ 13 anos de idade	Infusão intraportal de $1 \times 10^9$ células.	Sem mudança no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Faleceu 4 dias após procedimento.
Fisher et al.	Sódio de difenilidantoína (Dilantina)	Série de casos/ 27 anos de idade.	Infusão intraesplênica de $2.8 \times 10^7$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora do estadiamento grau 4 da encefalopatia. Submetido a um OLT, tendo total recuperação.
Fisher et al.	Carbamazepina (Tegretol)	Série de casos/ 14 anos de idade	Infusão intraportal de $2.5 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora do estadiamento de encefalopatia grau 4, submetido a OLT, tendo total recuperação.
Soriano et al.	Idiopática	Série de casos/ 3 anos de idade	Infusão intraportal de $3.6 \times 10^{10}$ células em um total de 9 infusões.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora da encefalopatia. Total recuperação.



Soriano et al.	Idiopática	Série de casos/ 5 anos de idade	Infusão intraportal de $1.4 \times 10^{10}$ células em um total de 7 infusões.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia; submetido a OLT depois de 04 dias, tendo recuperação total.
Sterling et al.	Idiopática	Série de casos/ 3 meses e 15 dias de idade	Infusão intraportal de $1.8 \times 10^8$ células.	Sem mudanças na encefalopatia. Foi submetido a OLT após 10 dias, tendo total recuperação.
Habibullah et al.	Idiopática	Série de casos/ 8 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ células fetais hepáticas/kg	Melhora da encefalopatia grau 3. Recuperação total.
Fisher et al.	Viral	Série de casos/ 4 anos de idade	Infusão intraportal de $3.4 \times 10^9$ células em um total de 2 infusões.	Melhora da encefalopatia grau 3. Progrediu para hemorragia intracraniana (morreu?)
Strom et al.	Halotano	Série de casos/ 43 anos de idade	Review article	Faleceu após 35 dias, em decorrência de SEPSE.
Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 32 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1.3 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis sanguíneos de amônia, melhora no estadiamento da encefalopatia grau 4. Faleceu após 14 dias em decorrência de uma sepse.

Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 32 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1 \times 10^{10}$ células.	Diminuição dos níveis sanguíneos de amônia, melhora no estadiamento da encefalopatia grau 4. Teve recuperação total
Fisher et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 35 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1.8 \times 10^9$ células com uma posterior infusão intraesplênica de $2.5 \times 10^7$ células.	Sem mudanças no estadiamento de encefalopatia grau 4. Faleceu no dia seguinte ao transplante em decorrência de morte encefálica.
Fisher et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 21 anos de idade	Infusão intraportal de $5.4 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis sanguíneos de amônia, melhora no estadiamento da encefalopatia grau 4. Faleceu após 14 dias em decorrência de uma sepse.
Fisher et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 35 anos de idade	Infusão intraportal de $3.7 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia; Recuperação total.
Fisher et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 35 anos de idade	Infusão intraportal de $3.9 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia; faleceu 3 dias após o transplante em decorrência de uma trombose mesentérica.
Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 51 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ hepatócitos fetais/kg	Não houve alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Morreu após 30 horas.

Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 32 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ hepatócitos fetais/kg	Não houve alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Morreu após 37 horas.
Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 29 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ hepatócitos fetais/kg	Não houve alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Morreu após 48 horas.
Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 20 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ hepatócitos fetais/kg	Melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia. Recuperação total
Bilir et al.	Abuso de diversas substâncias	Série de casos/ 20 anos de idade	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ hepatócitos fetais/kg	Melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia. Recuperação total
Bilir et al.	Clorofórmio	Série de casos/ 55 anos de idade	Infusão intraesplênica de $3.9 \times 10^{10}$ células.	Não houve alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Morreu após 06 horas, em decorrência de falência múltipla de órgãos.
Ott et al.	Etiologia desconhecida	Série de casos/ 23 anos de idade	Infusão intraesplênica de $4.38 \times 10^8$ células em um total de 2 infusões.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 3 da encefalopatia; OLT após 5 dias. Faleceu após 13 dias em decorrência de falência múltiplas de órgãos.

Fisher et al.	Síndrome de Reye	Série de casos/ 48 anos de idade	Infusão intraportal de $7.5 \times 10^8$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, sem alterações no estadiamento grau 4 da encefalopatia; faleceu após 01 dia de morte encefálica.
Ott et al.	<i>Amanita phalloides</i> (Fungo tóxico)	Série de casos/ 64 anos de idade	Infusão intraportal de $4.9 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia; obteve recuperação total.
Strom et al.	Pós-trissegmentomia cirúrgica.	Série de casos/ 69 anos de idade	Infusão intraesplênica de $5.3 \times 10^8$ células em um total de 2 infusões.	Sem alterações no estadiamento de encefalopatia (permaneceu grau 4). Faleceu após 2 dias (causa?)
Bilir et al.	Herpes II	Série de casos/ 29 anos de idade.	Infusão intraportal de $1 \times 10^{10}$ células.	Sem alterações no estadiamento de encefalopatia (permaneceu grau 4). Houve queda da satO2, falecendo após 18 horas.
Sterling et al.	Herpes II	Série de casos/ 37 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1.2 \times 10^8$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 4 da encefalopatia. Faleceu após 5 dias, em decorrência de uma sepse.
Bilir et al.	HBV	Série de casos/ 65 anos de idade	Infusão intraportal e intraesplênica de $3 \times 10^{10}$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 3 da encefalopatia. Faleceu após 52 dias, em decorrência de falha orgânica de múltiplos órgãos.

Strom et al.	HBV	Série de casos/ 28 anos de idade	Infusão intraesplênica de $1.69 \times 10^8$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 3 da encefalopatia OLT após 3 dias, tendo total recuperação.
Strom et al.	HBV	Série de casos/ 43 anos de idade.	Infusão intraportal de $7.29 \times 10^8$ células em um total de 3 infusões.	Sem alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). OLT após 1 dia, tendo recuperação total.
Habibullah et al.	HBV	Série de casos/ 40 anos de idade.	Infusão intraperitoneal de $6 \times 10^7$ células /kg	Sem alterações no estadiamento da encefalopatia (permaneceu 4). Faleceu após 13 horas.
Fisher et al.	HBV e cocaína	Série de casos/ 37 anos de idade.	Infusão intraesplênica de $8.8 \times 10^8$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 2 da encefalopatia. Obteve recuperação total.
Fisher et al.	HBV e linfoma	Série de casos/ 54 anos de idade.	Infusão intraportal de $6.6 \times 10^9$ células.	Diminuição dos níveis de amônia sanguíneo, melhora no estadiamento grau 2 da encefalopatia. Faleceu após 07 dias, em decorrência de falência múltipla de órgãos.

**Tabela 2:** Mostrando estudos conduzidos em humanos com insuficiência hepática aguda por diversas causas e tratados com terapia celular com hepatócitos.



## 11. APÊNDICES

### APÊNDICE I

#### Comprovante de aceitação do CEUA do Hospital São Rafa

HOSPITAL SÃO RAFAEL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA E TERAPIA CELULAR

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### Certificado de aprovação

**Protocolo:** 001/17

**Projeto:** Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais diretamente reprogramadas em hepatócitos em modelo de lesão hepática.

**Coordenador:** Bruno Solano de Freitas Souza

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de animais
C57Bl/6	200

O presente projeto está de acordo com os princípios de ética em pesquisa com animais vigentes na Lei 11.784/2008 aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO HOSPITAL SÃO RAFAEL (CEUA-HSR) em 14/12/2017 com validade até 14/12/2019.

Salvador, 14 de dezembro de 2017

Gisele Batista Carvalho  
 Médico Veterinário – Mat: 09749-G  
 CRMV BA 2654  
 Hospital São Rafael

Dra. Gisele Batista Carvalho

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - HSR

## APÊNDICE II

<b>Grau Clínico</b>	<b>Sinais e Sintomas</b>
Grau 0	Encefalopatia subclínica, pequenas mudanças na concentração, memória e coordenação; “Asterix” normalmente não está presente.
Grau 1	Dificuldade de concentração moderada, desvios de atenção e coordenação não pareada; pode ocorrer insônia, mudanças de personalidade e irritabilidade. “Asterix” pode estar presente, mas de forma inconsistente.
Grau 2	Desorientação, grandes dificuldades de concentração, mudanças grandes na personalidade, comportamento inadequado e sonolência. “Asterix” normalmente presente
Grau 3	Estupor, grande desorientação, impossibilidade de realizar atividades mentais, fala incoerente e muito confusa; “Asterix” presente.
Grau 4	Coma

Escala de WEST-HAVEN. Adaptado de Bernal *et al.*, 2013.