

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

ALEX JOSÉ DE MELO SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS TRANSDUZIDAS COM G-CSF EM MODELO EXPERIMENTAL
DE FIBROSE HEPÁTICA**

Recife

2019

ALEX JOSÉ DE MELO SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS TRANSDUZIDAS COM G-CSF EM MODELO EXPERIMENTAL
DE FIBROSE HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Dra. Veruska Cintia Alexandrino de Souza

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S586a Silva, Alex José de Melo.
Avaliação do potencial terapêutico de células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF em modelo experimental de fibrose hepática / Alex José de Melo Silva. – Recife: [s.n.], 2019.
80p. : il., tab., graf.

Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

Orientadoras: Sheilla Andrade de Oliveira, Veruska Cintia Alexandrino de Souza.

1. Terapia gênica. 2. Terapia celular. 3. Fibrose hepática. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Souza, Cintia Alexandrino de. III. Título.

CDU 616.36-004

ALEX JOSÉ DE MELO SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS TRANSDUZIDAS COM G-CSF EM MODELO EXPERIMENTAL
DE FIBROSE HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de aprovação: 29/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira (Orientadora)

Departamento de Imunologia/Instituto Aggeu Magalhães –FIOCRUZ

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Titular interno)

Departamento de Parasitologia/Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE

Dr. Antônio Pereira das Neves Neto (Titular externo)

Departamento de Microbiologia/ Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

*À minha família, em especial a minha mãe Cosma,
minha irmã Ana Paula e meu sobrinho Luiz Fernando.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e saúde concedida e pela disposição para realizar este trabalho. Agradeço também pela oportunidade concedida pelas minhas orientadoras Dra. Sheilla Andrade de Oliveira e Dra Veruska Cintia Alexandrino de Souza pela paciência e credibilidade para desenvolvê-lo junto à elas, além da pela paciência dedicada e por todos os ensinamentos transmitidos.

Às pessoas que sempre me compreenderam e que fizeram parte diretamente dessa caminhada ao longo desses dois anos, meus colegas do laboratório Camila Fernandes, Jéssica Lucena, Daniele Moura, Juliana Gama, Cleonilde Nascimento, Carlos Miranda, Miria Barbosa e Roni Araújo que me acompanharam desde o início e que contribuíram com bons momentos de conversas, aprendizados e diversão. Aos meus amigos(as) Ana Carla, Jair Figueiredo, Diego Lima, Márcio Nunes, Manoel Marcelino, Vantuir Freitas, Luiz Melo e Wilka Araújo pela companhia de sempre e pelos bons momentos de companhia. Aos meus amigos especiais que ganhei durante meu intercâmbio na Austrália: Estela Barbosa, Bruna Negromonte, Marcela Bernucci, Elaine Germinio, Fabiane Petrovics, Lumar Lucena e Daniel Freitas e todos os outros que estiveram e estão comigo sempre me apoiando e vibrando a cada conquista.

Agradeço também a um amigo muito especial que me ajuda muito e sempre com palavras de incentivo e tranquilidade; Thomas Hüneburg. E com toda compreensão, atenção, carinho, ensinamentos, afeto e presença, mesmo estando distante, e com conselhos que levarei para toda minha vida Dr. Sven Teichmann na Austrália.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e o Núcleo de Plataformas Tecnológicas, onde foram realizados os experimentos para realização desse trabalho, assim como pelo apoio financeiro concebido pelo CAPES.

Por fim, um agradecimento mais que especial às pessoas mais importantes da minha; minha mãe Cosma, minha irmã Ana Paula, e meu sobrinho Luiz Fernando por sempre acreditar em mim e sonhar junto comigo para que hoje esse sonho esteja se tornando realidade. Eu apenas quero dizer muito obrigado por sempre estarem ao meu lado na presença ou na ausência em todos os momentos da minha vida.

“O mais corajoso dos atos ainda é pensar com a própria cabeça.”

(Coco Chanel)

SILVA, Alex José de Melo. **Avaliação do potencial terapêutico de células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF em modelo experimental de fibrose hepática.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

As hepatopatias crônicas são um grave problema de saúde pública no mundo. A fibrose hepática resulta de uma resposta cicatricial devido a ação de estímulos inflamatórios crônicos e persistentes de diferentes origens. Os tratamentos ainda são limitados e para os pacientes em estágio avançado a alternativa terapêutica é o transplante de fígado. A terapia celular tem sido uma opção para o tratamento das hepatopatias crônicas. Assim, as células-tronco mesenquimais (CTMs) surgem como uma alternativa promissora, por suas características de plasticidade, perfil imunomodulatório e secreção de moléculas bioativas. A associação da terapia celular e gênica vem sendo investigada, destacando o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) como promissor. É uma citocina que pode mobilizar células da medula óssea para o sangue periférico e agir regenerando lesões em diversos órgãos. Diante disso, este trabalho avaliou a ação parácrina de CTMs geneticamente modificadas para superexpressar o G-CSF em modelo experimental de fibrose hepática. As CTMs_G-CSF, foram cedidas pela FIOCRUZ/BA, cultivadas e submetidas à caracterização funcional e imunofenotípica. O modelo crônico de fibrose hepática, foi estabelecido em camundongos da linhagem C57BL/6, infectados com cercárias de *Schistosoma mansoni*. A terapia com CTM MOCK, CTM_G-CSF e o G-CSF recombinante foi realizada por via intraperitoneal, semanalmente, por sete semanas. Oito semanas após a terapia, os animais foram eutanasiados, e coletado amostras de tecido hepático para análise estereológica e bioquímica. Os resultados demonstraram diminuição do tecido fibroso nos grupos tratados com CTM_G-CSF e CTM MOCK, sendo os dados significativos, nas análises estereológica e de hidroxiprolina ($p < 0,03$). O uso do G-CSF apresentou uma tendência a uma menor expressão do percentual de tecido fibroso ($p < 0,2$). As concentrações das citocinas TGF- β e IL-13 diminuíram nos grupos tratados com CTM MOCK e CTM_G-CSF ($p < 0,03$ e $p < 0,02$, respectivamente). Estes resultados nos permitem inferir que o transplante com CTM_G-CSF interviu no reparo hepático diminuindo o percentual de tecido fibroso e os níveis de citocinas pró-fibrogênicas. Maiores estudos são necessários para avaliar as possíveis vias envolvidas na melhora hepática.

Palavras-chave: Fibrose hepática. Terapia gênica. Terapia celular.

SILVA, Alex José de Melo. **Evaluation of therapeutic potential of mesenchymal stem cells transduced with G-CSF in hepatic fibrosis experimental model.** 2019. Dissertação (Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Chronic liver disease is a serious public health problem worldwide. Hepatic fibrosis results from a scarring response due to chronic and persistent inflammatory stimuli from different origins. Treatments are still limited and for patients in advanced stage the therapeutic alternative is liver transplantation. Cell therapy has been an option for the treatment of chronic hepatopathy. Thus, mesenchymal stem cells (MSCs) comes as promising alternative, due to their characteristics of plasticity, immunomodulatory profile and bioactive molecules secretion. The association of cell and gene therapy has been investigated, highlighting the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) as promising. It is a cytokine that can mobilize cells from the bone marrow to the peripheral blood and act regenerating damages in various organs. In view of this, this work evaluated the paracrine action of genetically modified MSCs to overexpress G-CSF in an experimental model of liver fibrosis. The CTMs_G-CSF were assigned by FIOCRUZ/BA, cultured and submitted to functional and immunophenotypic characterization. The chronic model of hepatic fibrosis was established in C57BL/6 mice line, infected with cercariae of *Schistosoma mansoni*. CTM MOCK, CTM_G-CSF and recombinant G-CSF therapy were performed intraperitoneally, weekly for seven weeks. Eight weeks after therapy, the animals were euthanized, and hepatic tissue samples were collected for stereological and biochemical analysis. The results showed a decrease in fibrous tissue in the groups treated with CTM_G-CSF and CTM MOCK, and the data were significant in the stereological and hydroxyproline analyzes ($p < 0.03$). The use of G-CSF showed a trend towards a lower expression of the percentage of fibrous tissue ($p < 0.2$). Concentrations of TGF- β and IL-13 cytokines decreased in the CTM MOCK and CTM_G-CSF treated groups ($p < 0.03$ and $p < 0.02$, respectively). These results allow us to infer that CTM_G-CSF transplantation intervened in hepatic repair by decreasing the percentage of fibrous tissue and the levels of pro-fibrogenic cytokines. Further studies are needed to evaluate the possible pathways involved in hepatic improvement.

Key words: Hepatic fibrosis. Gene therapy. Cellular therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais eventos no desenvolvimento da fibrogênese.....	20
Figura 2	Origem das células troncos sua plasticidade.....	21
Figura 3	Microambiente da medula óssea e seus componentes.....	22
Figura 4	Origem, expansão e diferenciação das CTMs.....	25
Figura 5	Ação das CTMs no tratamento da fibrose hepática.....	27
Figura 6	Principais vias de sinalização do G-CSFR.....	30
Figura 7	Potencial mecanismo de ação do G-CSF na regeneração hepática.....	31
Figura 8	Esquema do desenho experimental.....	41
Figura 9	Cultivo das CTMs: CTM_G-CSF e CTM MOCK.....	45
Figura 10	Diferenciação adipogênica e osteogênica das CTMs.....	46
Figura 11	Avaliação da expressão do gene G-CSF.....	47
Figura 12	Imunofenotipagem para macadores de superfície das CTMs_G-CSF...	48
Figura 13	Imunofenotipagem para macadores de superfície das CTMs MOCK..	49
Figura 14	Avaliação da fibrose hepática após terapia celular com CTMs.....	50
Figura 15	Avaliação dos granulomas hepáticos após terapia celular com CTMs..	50
Figura 16	Efeitos da terapia celular com CTMs no perfil hepático de mediadores e fatores reguladores da fibrose hepática.....	51
Figura 17	Efeitos da terapia celular com CTMs nos níveis de expressão de marcadores da fibrose hepática.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sequências de primers utilizados para amplificação do G-CSF por PCR convencional.....	39
Quadro 2	Condições de ciclagem utilizadas nas reações de PCR convencional	40
Quadro 3	Sequências de primers utilizados nas reações de qPCR.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α -SMA** – Alfa Actina de Músculo Liso
- Akt** - Proteína Quinase B
- CD** - Cluster differentiation
- CEHs** – Células Estreladas Hepáticas
- CFU-F** - Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos
- COL** - Colágeno
- CTs** – Células-Tronco
- CTH** – Célula-Tronco Hematopoiética
- CTMs** – Células-Tronco Mesenquimais
- DMEM** – Meio Eagle Modificado por Dubelcco
- ELISA**- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
- EGF** – Fator de Crescimento Epidermal
- EMT** – Transição Epitelial Mesenquimal
- eNOS /NOS3** – Óxido Nítrico Sintase Endotelial/Óxido Nítrico Sintase 3
- FDA** - Food and Drugs Administration
- G-CSF**- Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos
- G-CSFR**- Receptor de G-CSF
- GM-CSF** – Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos e Macrófagos
- HGF** – Fator de Crescimento de Hepatócitos
- IGF**- fator de crescimento semelhante à insulina
- HIF-1**- fatores que induzidos de hipóxia
- HLA** – Antígeno Leucocitário Humano
- IDO**- Indoleamina 2,3-dioxigenase
- IL** – Interleucina
- LSECs** – Células Endoteliais Sinusoidais
- MCP-1** – Proteína Quimiotática de Monócitos – 1
- M-CSF** – Fator de Crescimento de Colônia de Macrófagos
- MEC** – Matriz Extracelular
- MHC** - Complexo maior de histocompatibilidade
- MMP** – Metaloproteinase de Matriz
- NK** – *Natural killer*
- OMS** -Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

RTqPCR –Reverse Transcriptase quantitative real time polymerase chain reaction

SFB – Soro Fetal Bovino

SOCS – Supressor de Sinal de Citocina

SITC- Sociedade Internacional de Terapia Celular

SUS -Sistema Único de Saúde

TGF – β - Fator de Crescimento e Transformação β

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TIMP – Inibidor de Metaloproteinase Tecidual

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VCAM-1 - Molécula de Adesão Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Fibrose Hepática	18
2.2 Células-tronco	20
2.3 Células-tronco Mesenquimais	23
2.4 Terapia celular para fibrose hepática	26
2.5 Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)	28
2.6 Células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas	31
3 JUSTIFICATIVA	34
4 HIPÓTESE	35
5 OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo Geral	36
5.2 Objetivos específicos	36
6 MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1 Cultivo das CTMs	37
6.1.1 Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF (CTM_G-CSF)	37
6.2 Caracterização funcional e imunofenotípica das CTMs	37
6.2.1 Indução das diferenciações adipogênica e osteogênica das CTMs	37
6.2.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	38
6.3 Análise da expressão do G-CSF	39
6.4 Experimentação animal	40
6.5 Transplante celular	41
6.6 Análise estereológica	41
6.7 Dosagem da hidroxiprolina	42
6.8 Extração de RNA total e síntese de cDNA	42
6.9 Estudos moleculares	43
6.10 Ensaio Imunológicos	43
6.11 Análise Estatística	44
6.12 Considerações Éticas	44
7 RESULTADOS	45
7.1 Cultivo das CTMs	45
7.2 Evidenciação do potencial de diferenciação celular	46

7.3 Análise da expressão do gene G-CSF.....	47
7.4 Caracterização imunofenotípica das CTMs.....	47
7.5 Avaliação da fibrose hepática.....	49
7.6 Avaliação dos granulomas hepáticos.....	50
7.7 Análises imunológicas.....	51
7.7.1 <i>Análise do perfil de citocinas</i>	51
7.8 Análises moleculares.....	52
7.8.1 <i>Análise da expressão gênica</i>	52
8 DISCUSSÃO	53
9 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E USO ANIMAL (CEUA)	80

1 INTRODUÇÃO

As doenças do fígado são uma das grandes causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (KHOLODENKO; KOSTANTIN, 2016; SHAH et al., 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 46% das enfermidades e 59% das mortes no mundo são resultantes de problemas hepáticos (ALWASH; RASHIDI; HAY, 2017; MOKDAD et al., 2014; WILLIAMS, 2006; ZHANG et al., 2016). Essas doenças geralmente tem como principal característica o estabelecimento de um quadro de fibrose que se desenvolve a partir de agressões teciduais oriundas de diversas causas, como infecções virais, toxinas, uso abusivo de drogas, parasitoses, dentre outros. A fibrogênese resulta de estímulos inflamatórios crônicos e persistentes que leva a um desequilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular (MEC) levando a um intenso processo de cicatrização (DUFFIELD et al., 2013; EBRANIMI et al., 2016; FARZEI et al., 2018; HERNÁNDEZ-AQUINO MURIEL, 2018; LEE, FRIEDMAN, 2012; MORMONE et al., 2011; PINZANI, 2015; SCHUPPAN, KIM, 2013;). Neste processo, as células estreladas hepáticas (CEHs) participam ativamente. Uma vez ativadas, essas células alteram o seu fenótipo para miofibroblasto e se tornam a principal fonte de secreção de componentes da MEC (FRIEDMAN, 2008; KOT-BAKIERA et al., 2016; MORMONE et al., 2011; TSUCHIDA; FRIEDMAN, 2017).

Os tratamentos das doenças crônicas do fígado são limitados, e na maioria das vezes direcionam-se a remover e/ou suprimir os estímulos inflamatórios causadores dos danos associado ao desenvolvimento do processo fibrótico. Como consequência, em casos de estágio final da doença hepática, o transplante é a única alternativa para prolongar a vida do paciente (JIANG, TOROK, 2013; PELLICORO et al., 2012). Todavia, o transplante hepático é um procedimento altamente invasivo, além da baixa disponibilidade de órgãos para transplante no sistema único de saúde (SUS) e da dependência por medicamentos imunossupressores, e da possibilidade de rejeição do órgão (MAHLA, 2016; PELLICORO; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2012). Sendo assim, é necessário que se desenvolvam novas terapias que proporcionem a redução das lesões teciduais e que propiciem a reconstituição da função hepática (MORMONE; GEORGE; NIETO, 2011).

Dentre as prováveis alternativas terapêuticas, a terapia celular é uma das grandes e potenciais alternativas para a melhora da qualidade de vida dos pacientes (ENOSAWA; HAGA; KOBAYASHI, 2016). A terapia com células-tronco, sobretudo com células tronco mesenquimais (CTMs), surgiu no campo da medicina regenerativa como uma potencial

alternativa terapêutica para as hepatopatias crônicas (GOUNDER et al., 2017). Estudos em modelos experimentais de lesões crônicas, demonstraram que a infusão de CTMs em camundongos, apresentou melhora da função hepática e diminuição dos níveis de fibrose e do fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (FANG et al., 2004; JANG et al., 2004; NASIR et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2012; RAAFAT et al., 2015). Além disso, estes animais apresentaram aumento da regeneração hepática e diminuição da taxa de mortalidade (SAKAIDA et al., 2004; SOUZA et al., 2012; VOLAREVIC, 2014; YANNAKI et al., 2005; ZHAO et al., 2005). As CTMs são células de origem não hematopoiéticas multipotentes com propriedades de autorenovação e imuno-modulatórias. Seu papel na regeneração de lesões hepáticas se dá através da indução da apoptose das CEHs (BERNARDIS et al., 2015; JANG et al., 2013; VOLAREVIC, 2011; WANG et al., 2018; XAGORARI et al., 2013). Estudos tem demonstrado que as CTMs possuem capacidade de diferenciação *in vitro* em células das linhagens do tecido conjuntivo como adipócitos, condrócitos e osteoblastos, principalmente. (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011, WANG et al., 2018).

O uso do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) na mobilização de células-tronco da medula óssea em pacientes com cirrose hepática vem sendo utilizado em modelo animal e em seres humanos (CHAVEZ-TAPIA et al., 2015; YANG et al., 2016). O G-CSF é produzido por diversos tipos celulares e possui capacidade de mobilizar células progenitoras da medula óssea para o sangue periférico, possibilitando sua chegada às áreas de lesão e atuando no processo de reparo, mostrando-se seguro e eficaz na regeneração do tecido hepático após lesões (AVALOS, 1996; MOREAU; RAUTOU, 2014; SINGH et al., 2018; SCHMITZ et al. 2002; LU; LINK; XIAO, 2007). O uso de terapias associando G-CSF às CTMs tem demonstrado melhora das funções hepáticas em modelos murinos o que já foi evidenciado em pacientes após os primeiros meses de terapia (SAHA et al., 2017; SALAMA et al., 2014; YANNAKI et al., 2005, 2006).

Na busca de alternativas terapêuticas seguras e que apresentem resultados mais duradouros, o presente projeto traz como proposta avaliar a ação parácrina de células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas para superexpressar G-CSF em modelo experimental de fibrose hepática, com a finalidade de contribuir através da terapia gênica e celular para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica mais eficaz no tratamento das doenças hepáticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Uma visão geral dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da fibrose hepática e suas alternativas terapêuticas.

2.1 Fibrose Hepática

O fígado é um dos órgãos mais vitais do corpo, sendo um dos principais a promover a metabolização de nutrientes e excreção de metabólitos resultantes, promovendo assim a detoxificação do organismo. Devido à essas funções, este órgão é passível de sofrer danos por toxinas as quais são ingeridas, como por exemplo excesso de álcool, que quando metabolizado gera produtos como acetaldeídos e hidrogênio que afetam as mitocôndrias e causam acúmulo de gordura no órgão, respectivamente (OZOUGWU, 2017; TAUB, 2004). Além disso, o fígado é formado por uma grande rede de células retículo endoteliais do corpo, desempenhando importante função na defesa contra microrganismos invasores, contendo componentes que participam tanto da imunidade inata quanto adaptativa (KOROMI; MIGITA, 2009; OZOUGWU, 2017). Este órgão possui uma alta capacidade regenerativa sendo um processo bastante complexo (GILGENKRANTZ; L'HORTET, 2018). Mesmo após danos contínuos, ele se regenera de forma eficiente podendo reestabelecer sua massa tecidual e suas funções, necessitando assim da ação coordenada de células da resposta imunológica, incluindo macrófagos, eosinófilos e células T. (ALISON; BOULTON; GOLDING et al., 1998; BOULTON et al., 1997; GOH et al., 2013; MEIJER et al., 2000).

Nesse processo, pode ocorrer a mobilização de fatores de crescimento hepático, remodelação da MEC, além de uma rápida e controlada proliferação epitelial na tentativa de recuperar a massa do órgão que foi perdida. Porém, quando submetido a determinados estímulos agressores, tanto de natureza aguda quanto crônica essa capacidade de regeneração pode ser comprometida (FORBES; ROSENTAL, 2014). Nesses casos, as áreas funcionais de tecido hepático são substituídas por tecido de cicatrização, numa tentativa do organismo de dar uma maior sustentação as estruturas ductais e vasculares. Todavia, com a permanência do estímulo agressor ocorre um desequilíbrio entre a síntese e degradação da MEC levando a formação de extensas áreas de tecido fibroso (PINZANI, 2015).

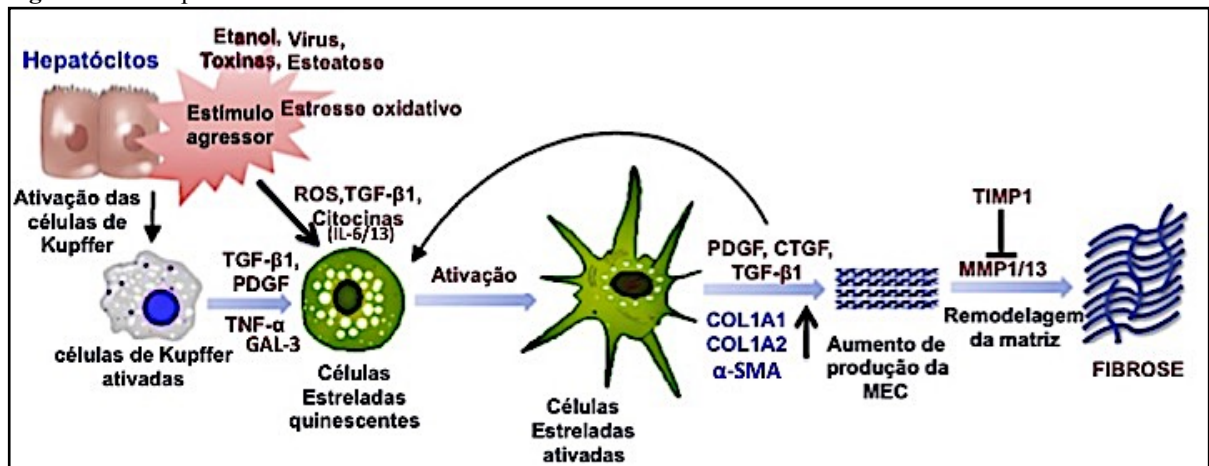
A fibrose hepática é um processo complexo e reversível, que resulta do desequilíbrio entre a resposta a danos agudos ou crônicos no fígado, que induz a deposição de material

fibroso excedendo o normal processo de cicatrização. Esta é uma tentativa de reparo que leva a formação de um processo cicatricial excessivo no órgão (CORDERO-ESPINOZA; HUCH; 2018; GILGENKRANTZ; L'HORTET, 2018; LEE; FRIEDMAN, 2011). A fibrose é um processo dinâmico, causado por diversos agentes a exemplo dos vírus da hepatite (A, B e C), toxinas, colestase, parasitoses como a esquistossomose, causas metabólicas, esteatose hepática, ingestão excessiva de álcool e doenças autoimunes (TRAUTWEIN et al., 2015). Os processos inflamatórios resultante dos estímulos agressores, incitam a ativação das células estreladas hepáticas (CEHs), que em estado normal se encontram quiescente no espaço perisinusoidal de Disse, onde têm a capacidade de armazenar ésteres de retinil em gotículas intracelular de lipídeos, sendo chamadas também de células que armazenam gordura ou células ricas em vitamina A (EBRAHIMI et al., 2016; WEISKIRCHEN et al., 2018).

Na presença de estímulos autócrinos ou parácrinos no tecido hepático, citocinas fibrogênicas como fatores de crescimento tecidual beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 6 e 13, galectina 3 entre outras liberadas pelos danos, e também pelas células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) ativadas são secretadas, possibilitando que as CEHs sofram um processo de transdiferenciação, que as levam a alterarem seu fenótipo quiescente, para um estado ativado de miofibroblastos (um dos principais a secretar componentes da MEC e que expressam altos níveis de colágeno e inibidores teciduais de metaloproteinases, TIMPs). A transição do fenótipo quiescente para ativado leva a um aumento da expressão de alfa actina de músculo liso (α -SMA) por essas células, que são contribuidores dominantes do processo de fibrose hepática. Apesar de outras células contribuírem para a fibrogênese hepática, este processo está sobretudo associado à ativação das CEHs no fígado (CORDERO-ESPINOZA; HUCH, 2018; LEE; FRIEDMAN, 2011).

No fígado, quando estas células são ativadas, elas perdem seus depósitos de vitamina A, passando a produzirem em maior quantidade componentes da MEC (colágenos tipos I, II e III, proteoglicanos e glicoproteínas de matriz como a fibronectina e laminina). No tecido hepático, a estabilidade dos componentes da MEC é regulada pelas Metaloproteinases (MMPs) e por seus inibidores teciduais específicos (TIMPs). Uma vez inibida pelos TIMPs, as MMPs não são capazes de degradar os componentes da MEC acumulados, o que leva assim a uma remodelação destes componentes originando um quadro fibrogênico (figura 1) (GEORGE; MORMONE; NIETO, 2011).

Figura 1- Principais eventos no desenvolvimento da fibrose.



Fonte: Adaptado de Mormone et al. (2011, tradução nossa).

Nota: As CEHs em condições normais, encontram-se localizadas no espaço perisinusoidal de Disse, onde atuam como uma das principais células armazenadoras de vitamina A. Estas células quando sofrem ação dos estímulos inflamatórios originados dos danos causados aos hepatócitos, são ativadas. As células de Kupffer formam um eixo funcional com as CEHs participando também de sua ativando. Quando, ativadas, as CEHs produzem componentes mais MEC, que quando não são degradados pelas MMPs, sofrem remodelação e assim a síntese de MEC torna-se superior a sua degradação desenvolvendo-se a fibrogênese hepática.

Legenda: CEH: Célula estrelada hepática; MEC: matriz extracelular

Estudos têm demonstrado que, em situações nas quais é possível retirar o estímulo agressor, o processo de fibrose é reversível e o órgão assim como suas funções podem ser restabelecido. Trabalhos em modelos animal e humano, mostraram que a eliminação ou o controle da doença de base é um dos tratamentos mais efetivos, estando o sucesso relacionado com o bloqueio da apoptose dos hepatócitos, indução da apoptose dos miofibroblastos e apoptose, inativação e/ou quiescência das CEHs ativadas (BISWAS, SHARMA, 2016; LEMOINNE et al., 2013). Porém, devido a inexistência de tratamentos eficientes para a resolução desse quadro patológico, se faz necessária a busca por novas alternativas terapêuticas, afim de conferir um tratamento mais eficaz para os pacientes acometidos com doenças do fígado.

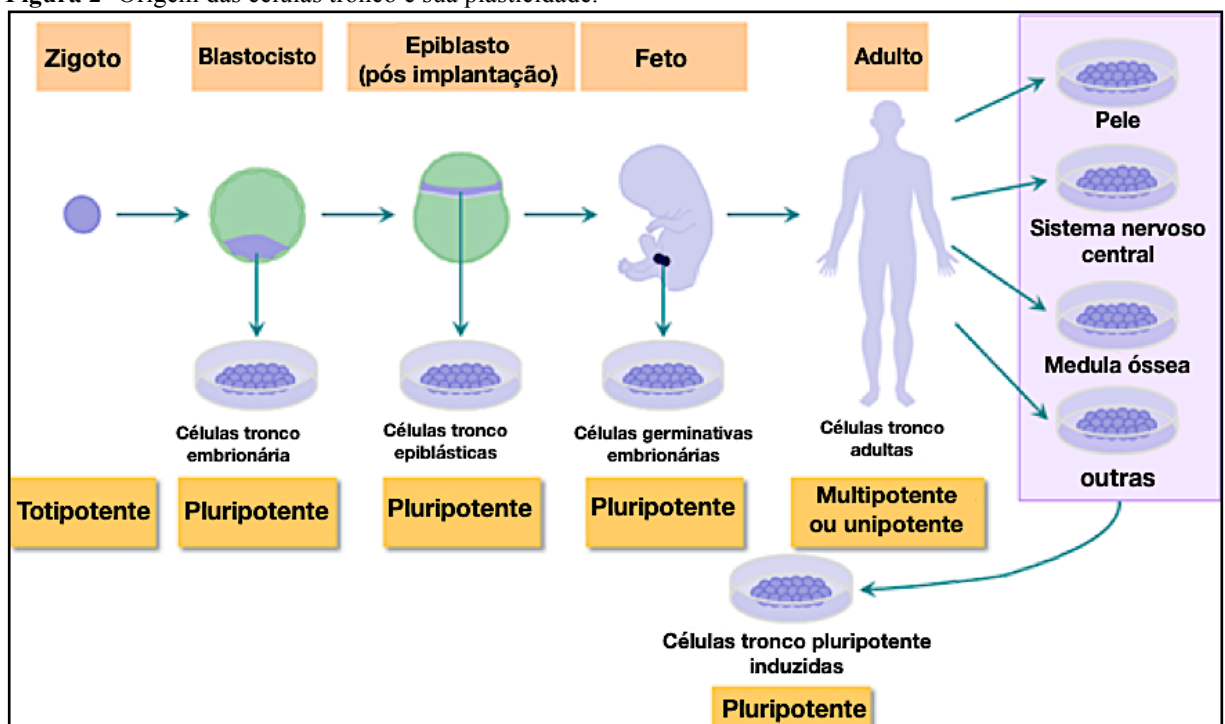
2.2 Células-tronco

As células tronco (CTs), são definidas como células indiferenciadas que quando se dividem podem dar origem a células de várias linhagens (CHAGASTELLES; NARDI, 2011). Estas células podem ser encontradas nos estágios embrionário, fetal e adulto. Além disso, possuem potencial de diferenciação, que é um processo pelo qual estas passam a assumir novas características morfológicas e também fenotípicas, o que as tornam células especializadas e com função específica sob condições experimental e fisiológica (KRAUSE;

THEISE, 2002; VIJAYALAKSHMY et al., 2018). Além disso, as CTs possuem uma plasticidade (capacidade de diferenciação em diferentes linhagens) podendo ser caracterizadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou onipotentes (CHAGASTELLES; NARDI; 2011). As células totipotentes podem ser representadas pelo zigoto e pelas células de um embrião recém formado (blastocisto), possuindo a capacidade de dar origem a qualquer célula de qualquer órgão ou sistema do corpo (BONGSO; RICHARDS, 2003).

As células pluripotentes tem uma capacidade ilimitada de auto-renovação, podendo se diferenciar em células dos três folhetos embrionários ectoderma, mesoderma e endoderma. (NGUYEN et al., 2018). As células multipotentes ou unipotente são células com capacidade de diferenciação limitada, porém podem se diferenciar em todos os tipos celulares de uma determinada linhagem como no caso de células hematopoéticas e mesenquimais (DEL CARLO et al., 2009; SOBHANI et al., 2016) (figura 2). Assim, estas células tem a habilidade de auto renovação clonal, o que as permite se dividirem durante vários ciclos celulares mantendo seu estado indiferenciado, e sua potencialidade de se diferenciar em mais de um tipo celular especializado (KOPP et al., 2016).

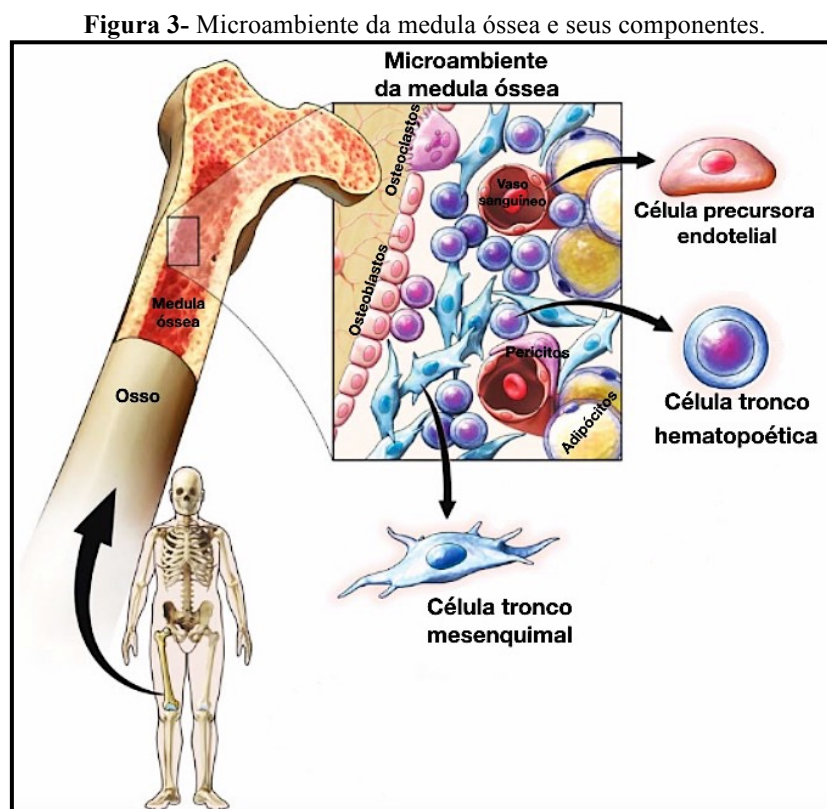
Figura 2- Origem das células tronco e sua plasticidade.



Fonte: Balogh, Engelman (2011, tradução nossa).

Nota: As células-tronco podem ser definidas de acordo com sua plasticidade em totipotentes quando são capazes de formar células dos três tecidos embrionários, pluripotentes se estas tem a capacidade de formar células de todos os tipo de um organismo adulto. Já as células multipotentes conseguem formar células de tecidos específicos.

O microambiente da medula óssea é um ambiente bastante heterogêneo que compreende diversos tipos celulares como osteoblastos, adipócitos e diversos outros tipo de CTs como a hematopoética (CTHs) e mesenquimais (CTMs). Além disso, possui vasos e células do tecido sanguíneo já totalmente diferenciados (Figura 3) (ZHOU et al., 2017). Além das CTHs, as CTMs são células não hematopoética com propriedade de auto renovação, que funcionam como um microambiente de suporte para as CTHs. Estas células possuem capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo*, quando submetidas a estímulos indutores (PEREIRA, 2008; RAAF, 2003; VERFAILLIE, et al., 2003). As células tronco hematopoéticas, são responsáveis por dar origem a diversas células do tecido sanguíneo, e atualmente são utilizadas para o tratamento de diversas doenças que afetam o processo de hematopoeise, sobretudo em casos de cânceres como em casos de leucemias (BYDŁOWSKI et al., 2009; PASSWEG et al., 2016)



Fonte: Adaptado de Qadura et al. (2017, tradução nossa).

Nota: O microambiente da medula óssea é composto por um grande número de células dentre as quais encontram-se as células tronco hematopoéticas, que darão origem à células progenitoras mieloide como também as células do sistema imunológico e as células tronco mesenquimais. Além disso, este microambiente vasos sanguíneos, adipócitos, osteoblastos e osteoclastos dentre outros tipos celulares específicos.

A capacidade de regeneração tecidual promovida pelas células-tronco da medula óssea, tem sido de extrema importância na sua escolha para fins terapêuticos, fortalecendo um novo panorama no campo da medicina regenerativa. Sua plasticidade e potencial regenerativo, bem como o seu fácil cultivo e isolamento, são características primordiais para sua utilização no tratamento de diversas doenças, tais como distúrbios hematológicos, doenças crônico-degenerativas e alguns tipos de cânceres (LJUNGMAN et al., 2006; LI et al., 2017). O transplante através de enxertos não autólogos ou autólogos tem sido muito utilizado para reconstituição de órgãos e de tecidos lesados grave e extensivamente (KIRBY et al., 2015). Ensaios experimentais em terapia celular com CTMs em modelos de cardiopatias, mostraram uma melhora com consequente regeneração do tecido cardíaco. Em um estudo clínico de fase 1 com pacientes acometidos com uma doença neurodegenerativa (lipofucose ceróide), mostrou que a transdiferenciação em células neuronais possibilitou uma melhora clínica e que as CTs promoveram uma proteção neuronal. Esse estudo foi um dos pioneiros, possibilitando a aceitação e aprovação do primeiro estudo clínico com CTs pela Food and Drugs Administration (FDA) (QADURA, 2018; SCHWARZ; SCHWARZ, 2010; TROUNSON et al., 2011).

Estudos conduzidos por Bhansali em 2009, mostraram que o transplante de CTs promoveu melhora em pacientes diagnosticados com Diabetes tipos I e II, através do aumento dos níveis de peptídeo C e HbA1c, além de diminuição da produção de auto-anticorpos contra as células do pâncreas (BHARTIYA, 2016). Além disso, um estudo realizado em modelo murino de fibrose hepática, induzido pela administração de tetracloreto de carbono, a terapia com CTs de medula óssea teve ação antifibrogênica, bem como contribuiu para melhora nos parâmetros funcionais hepáticos (ABDELAZIZ et al., 2007). Tais resultados contribuíram para o avanço nas pesquisas em terapia celular para vários outros modelos de doenças.

2.3 Células-tronco Mesenquimais

O processo de manutenção e reparo de órgãos e tecidos são mantidos devido a um pool de células tronco adultas que neles residem. Dentre estas células, as CTMs, são fortes candidatas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (TURINETTO et al., 2016). As CTMs foram descritas primeiramente por Fridenstein e colaboradores em 1976, sendo caracterizadas como células aderentes ao plástico, que em cultura crescem em monocamada, e que apresentam potencial de diferenciação em células da linhagem

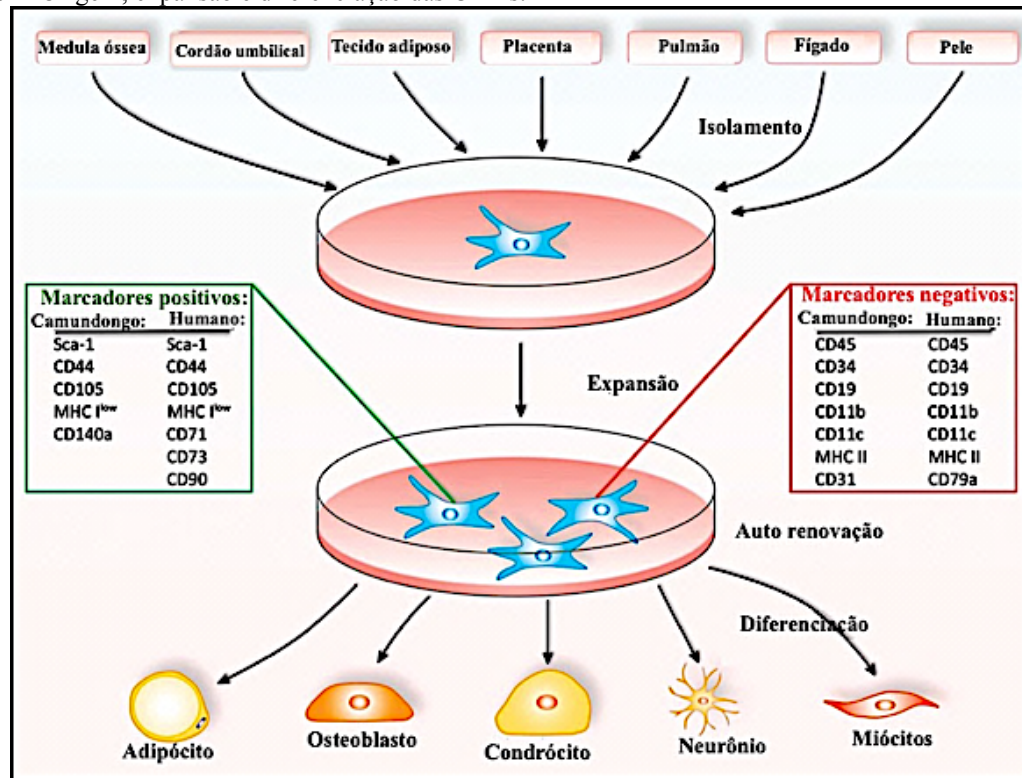
adipogênica, osteogênica e condrogênica (WANG et al., 2018). Os estudos com CTMs, têm mostrado que estas podem sofrer transdiferenciação em células altamente especializadas, a exemplo dos neurônios, fibroblastos e miócitos, dentre outros tipos (figura 4) (BOBIS & MAJKA, 2006; CHEN et al., 2016; FRIEDENSTEIN, et al., 1976; KANG, et al., 2014; SHIN, et al., 2017, WANG et al., 2018). A medula óssea, tem sido a fonte de CTMs mais explorada nos últimos anos. As CTMs, correspondem a cerca de 0,001-0,1% das células totais da medula (CHEN et al., 2016). Apesar de terem sido descritas como células do estroma medular, atualmente as CTMs podem ser obtidas e isoladas a partir diversas outras fontes, tais como pele, tecido adiposo, membrana sinovial, polpa dentária, periosteo, músculos, sangue periférico, sangue menstrual e endometrial, cérvix uterina, tecidos fetal, placenta, cordão umbilical entre outros tipos de tecidos. Embora sejam obtidas de diferentes origens, estas células apresentam propriedades *in vitro* bastante semelhantes (DELORME, 2010; FIORE et al., 2015; HUA et al., 2009; ORCIANI; DI PRIMIO, 2013; SHIN et al., 2017; VIZOSO et al., 2017; WANG et al., 2018).

Estudos têm mostrado que as CTMs apresentam baixa imunogenicidade e alta histocompatibilidade, devido à baixa expressão de complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e ausência de MHC de classe II. Este requisito, reforça a segurança que o uso de tal tipo celular possui como modalidade terapêutica, oferecendo uma maior segurança em um ambiente alogênico, sem um possível risco de rejeição por parte do receptor (CHEN et al., 2009; HE et al., 2018; KOPPULA et al., 2009).

As CTMs constituem uma população celular com heterogeneidade fisiológica, morfológica e no perfil de expressão de antígenos de superfície. Estas células, além de sua propriedade de diferenciação em linhagens específicas, apresentam um grande número de moléculas de adesão e receptores para fatores de crescimento, bem como podem estar envolvidas na produção de citocinas e de proteínas da MEC (BOBIS; 2006; DEVINE; HOFFMAN, 2000). Em 2006, o comitê de células tronco mesenquimais e tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), estabeleceu um conjunto de critérios para caracterização das CTMs isoladas da medula óssea, assim como de outros tecido, tais como: Aderência ao plástico, quando mantidas sob condições de cultura; expressão de alguns macadores de superfície como o CD44, CD105 (SH2 endogleína), CD106 (Molécula de adesão celular vascular; VCAM-1), CD166, CD29, CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), CD117, STRO-1 e Sca-1. Além disso, as CTMs foram definidas como células que apresentam uma baixa expressão de marcadores de superfície como o CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79, CD19 e o HLA-DR, porém a expressão destes marcadores variam de

acordo com o organismo de origem (figura 4) (BADDOO et al., 2003; BOIRET et al., 2005; DENNIS et al., 2002; GRONTHOS et al., 2003; SAMSONRAJ et al., 2017; VIZOSO et al., 2017)

Figura 4- Origem, expansão e diferenciação das CTMs.



Fonte: Adaptado de Chen et al., (2016, tradução nossa).

Nota: As CTMs podem ser isoladas de diversas fontes de tecidos, expandidas e diferenciadas em determinadas linhagens de células do estroma, como adipócitos, osteoblastos, condrocitos. Além disso, uma combinação de marcadores positivos e negativos podem ser usados para caracterizá-las.

Outra característica bastante relevante para se caracterizar as CTMs, é a sua multipotencialidade. Em condições *in vitro* e *in vivo*, a adesão celular à MEC é um dos pontos chaves para acontecer a sua proliferação, migração e diferenciação. (BIRMINGHAM et al., 2012; CHEN et al., 2016; KILIAN et al., 2010; SEN et al., 2017). Durante o processo de diferenciação das CTMs para uma linhagem celular específica, múltiplos estímulos e inibidores exercem papel importante no processo inicial, e também em estágios mais avançados. Esse processo é controlado por citocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição e também por meio de moléculas associadas à MEC. Nas condições *in vitro*, esse processo requer indutores específicos (AGRAWAL; ALMALKI, 2016; SEN et al., 2017). O processo de diferenciação das CTMs basicamente acontece em duas etapas que é o comprometimento com uma determinada linhagem, o qual as CTMs originam progenitores

de linhagens específicas, e o processo de maturação, no qual os progenitores se diferenciam em células nas quais estão comprometidos (CHEN et al., 2016).

Durante algumas décadas, o transplante das CTs tem sido de suma relevância para o reparo tecidual dentro do campo da medicina regenerativa. Estudos pré-clínicos demonstraram resultados bastante promissores no que se relaciona ao tratamento de diversas doenças, como no caso da esclerose múltipla, fazendo com que o uso das CTMs na terapia celular progredisse para aplicações cada vez mais avançadas em vários estudos clínicos (BALDASSARI; COHEN, 2018). Apesar dos avanços, discussões ainda permanecem frequentes a respeito de qual tipo celular e fonte seria mais eficaz para serem usadas como aplicações terapêuticas. Apesar disso, sabe-se que as CTMs atualmente, são tidas como uma das populações celulares bastante promissoras, devido ao seu potencial de baixa imunogenicidade para serem utilizadas em estudos tanto experimentais quanto clínicos em diferentes organismos (BALDASSARI; COHEN, 2018; MEIERHENRY et al., 2015).

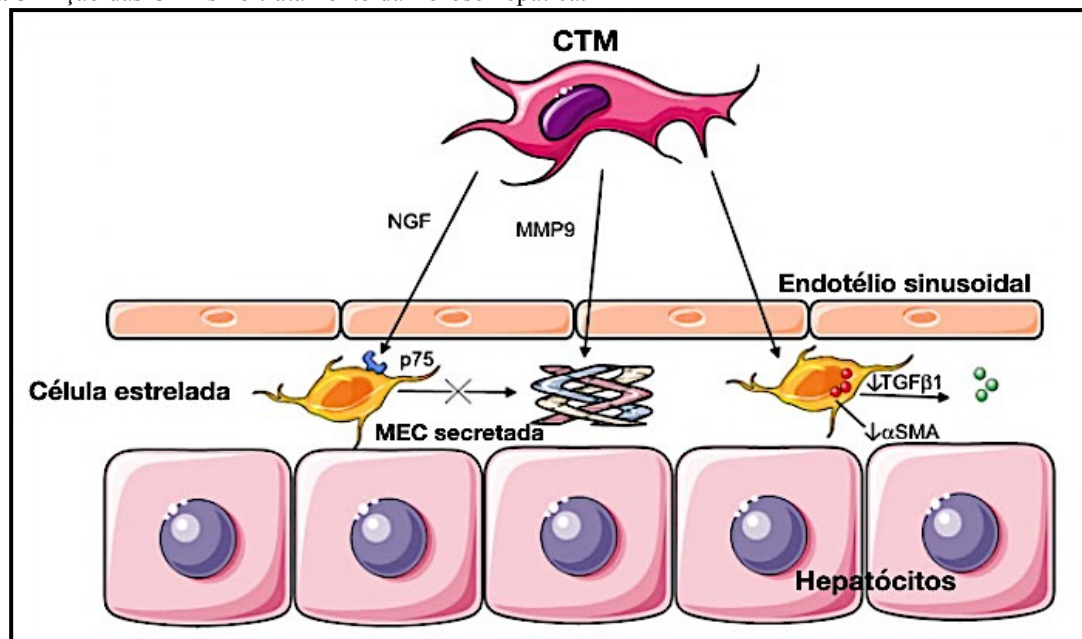
2.4 Terapia celular para fibrose hepática

Atualmente, as terapias requeridas para o tratamento das doenças crônicas do fígado está voltada basicamente para o tratamento das doenças de base (FORBES, 2008; NEWSOME; OWEN, 2015). Estudos experimentais e clínicos com terapia celular demonstrou que a melhora da função hepática é atribuída a mecanismos distintos sendo eles: a capacidade de diferenciação das células-tronco em hepatócitos e às características imunomodulatórias com secreção de citocinas anti-inflamatórias e antifibrogênicas (FERRER et al., 2015). Os estudos experimentais demonstram ainda que após a infusão celular, há uma diminuição dos níveis de fibrose e inflamação, aumento da regeneração tecidual, diminuição da apoptose de hepatócitos, diminuição de mortalidade e melhora nos padrões bioquímicos (LIANG et al., 2004; NASIR et al., 2013). A terapia celular também vem mostrando-se promissora para o tratamento em seres humanos acometidos de lesões hepáticas crônicas (VOLAREVIC, 2014). Inicialmente, as células-tronco de medula óssea foram a população mais utilizada na terapia celular, todavia, a alta capacidade imunomodulatória das CTMs, sua capacidade de expansão e sua baixa imunogenicidade têm trazido muitas contribuições na literatura sobre os benefícios destas células no reparo hepático (CHEN et al., 2009).

Em um estudo pré clínico com modelo de cirrose foi demonstrado que as CTMs melhoram as funções hepáticas por meio da ação sobre as CEHs. Sua ação é desempenhada

através do fator de crescimento nervoso (NGF), que se liga à molécula p75 expressa em CEHs ativadas. Esta ligação leva à apoptose das CEHs, que conseqüentemente diminui a secreção de componentes da MEC no tecido hepático. As CTMs também secretam MMPs que são capazes de degradar o colágeno tipo 1. Além disso, estas células agem promovendo a diminuição da secreção de α -SMA e TGF- β pelas CEHs ativadas (figura 5) (NEWSOME; OWEN, 2015). Evidências científicas tem indicado que as CTMs possuem a habilidade de estimular a angiogênese e produzir fatores tróficos, que são secretados e que exercem um papel importante no processo de regeneração e na redução do processo inflamatório. Estes mecanismos levam as CTMs a migrarem para o local da lesão e se diferenciarem em hepatócitos, promovendo a reconstituição do tecido hepático e ao conseqüente restabelecimento das funções do órgão (BATALLER, 2016; EOM et al., 2015; NEWSOME; OWEN; SHAH, 2015; SI-TAYEB, et al., 2010; WANG et al., 2009).

Figura 5- Ação das CTMs no tratamento da fibrose hepática.



Fonte: Owen, Newsome, (2015, tradução nossa).

Nota: As CTMs tem papel importante no tratamento da fibrose hepática através da ligação as CEHs bloqueando a secreção da MEC. Além disso, agem secretando MMPs que degradam o colágeno e também tem papel na diminuição dos níveis de α -SMA e TGF- β .

Legenda: CTM: Células Tronco Mesenquimais, CEHs: Células Estreladas Hepáticas, MEC: Matriz Extracelular, α -SMA: Alfa Actina de Músculo Liso, TGF- β : Fator de Crescimento Tecidual- β .

O processo pelo qual as CTMs promovem uma atenuação da resposta inflamatória, assim como a redução das áreas de lesão hepática, ocorre por meio da produção de citocinas inflamatórias e outras moléculas que contribuem para uma proteção do ambiente hepático

(GAZDIC et al., 2017). Assim, as CTMs podem promover uma imunomodulação por meio da expressão de diversos fatores solúveis que regulam a proliferação, como também as funções de diversas células do sistema imune, induzindo a ativação de células T regulatórias. Dentre os fatores solúveis destacam-se a prostaglandina E2 (PGE2), o óxido nítrico, a IL-6, IL-10, HLA-G e a Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (SHARMA, et al., 2014). A PGE2 promove o aumento da IL-10 e consequente diminuição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além da diminuição do interferon γ (INF- γ) e da IL-12 em células dendríticas (DC). Além disso, a IDO e o HLA-G atuam na supressão das células T-regulatórias, o que se reflete em uma inibição na secreção de imunoglobulina G (IgG) por células B. Sendo assim, as CTMs podem inibir a ativação das células imunes por meio de contato célula-célula (EOM et al., 2015; PAREKKADAN et al., 2007; VOLAREVIC et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que a terapia celular com CTMs para as doenças do fígado é uma alternativa bastante promissora, considerando suas características fisiológicas e potencial de diferenciação. Porém, limitações como tempo de sobrevivência das células e sua segurança após o transplante celular ainda é discutido (NEWSOME; OWEN, 2015; ZHAO et al., 2016). Portanto, é necessário se traçar estratégias que permitam o aumento da sobrevivência dessas células após o transplante, a fim de torná-las mais eficazes no tratamento das doenças que acometem o fígado.

2.5 Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)

O Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína que pertence à família dos fatores estimuladores de colônia (CSF). O gene do G-CSF está localizado na região 17q11.2-q21 no cromossomo 17 possuindo 207 aminoácidos. Esta família inclui os fatores CSF1 ou também conhecido como CSF macrófagos (M-CSF), o CSF-2 denominado de CSF macrófago e granulocítico (GM-CSF) e o CSF-3 conhecido como o CSF de granulócitos denominado de G-CSF (CETEAN et al, 2011; RAHMATI et al., 2015; ROOT; DALE, 1999; SIMMERS et al., 1987). O G-CSF, tem sua produção associada a diferentes tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos, neurônios, plaquetas, assim como à células com propriedades de imunocompetência como monócitos e macrófagos (BUSSOLINO et al., 1998; CETEAN et al., 2015; WÜRFEL, 2015).

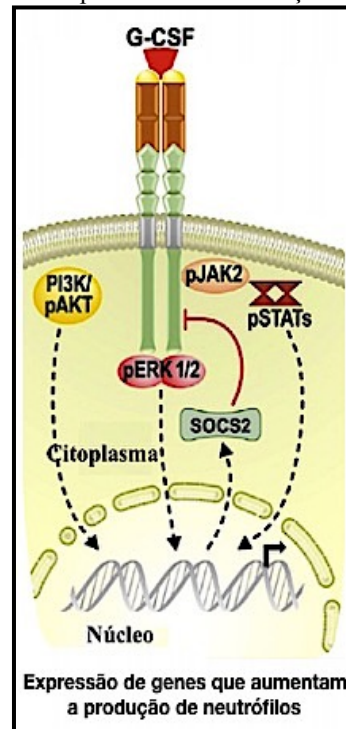
O G-CSF possui propriedade de regular o crescimento, diferenciação, migração e funções efetoras de alguns tipos celulares na medula óssea, em locais de inflamação e

também na corrente sanguínea. Além disso, é mais eficaz que outros fatores da sua família quando relacionado a mobilizar células progenitoras hematopoéticas e leucócitos (CETEAN, 2015). Este fator tem ação direta sobre os precursores neutrofílicos levando-os a crescerem, diferenciarem e desempenhar suas funções específicas, além de possibilitar que estas células produzam granulócitos e liberem-os na corrente sanguínea (YANG et al., 2016). O G-CSF é bastante utilizado na prática clínica, devido a sua capacidade de melhorar estados imunossupressivos em pacientes submetidos à quimioterapia ou radioterapia. Devido a estas propriedades, esta citocina é administrada em doadores permitindo assim a mobilização das células da medula óssea para o sangue periférico em momentos que antecedem a coleta das células tronco, e em alguns casos antes da coleta de medula óssea (DEOTARE et al., 2015; RUTELLA, 2007).

O G-CSF juntamente com o seu receptor desempenham papéis essenciais na produção de neutrófilos, mesmo em condições basais e também quando influenciado por alguns mecanismos infecciosos, em condições de emergência fisiológica. O receptor do G-CSF (G-CSFR) pertence a superfamília de citocinas, sendo primariamente detectado em células hematopoéticas, é uma proteína transmembrana constituída por 813 aminoácidos, sendo distribuídos 604 no domínio transmembranar, 26 no domínio intermembranar e 183 na parte intracitoplasmática.

O G-CSFR se encontra em superfícies de células responsáveis, principalmente em células progenitoras da linhagem mieloide, que faz com que este tenha ação sobre a mielopoese. Ao se ligar com seu receptor, o fator induz a fosforilação da proteína tirosina intracelularmente e dispara diversas vias de sinalização (figura 6) (TIDOW; WELTE, 1997). Os efeitos das vias de sinalização, estão relacionadas com a indução da proliferação celular, processos anti-apoptóticos e anti-inflamatórios. Além disso, estas vias desempenham papel importante no processo de mobilização das células tronco para sítos de lesão (ADSUMILLI et al., 2012; DWIVEDI; GREIS, 2017).

Figura 6- Principais vias de sinalização do G-CSFR.



Fonte: Adaptado de Dwivedi, Greis (2017, tradução nossa).

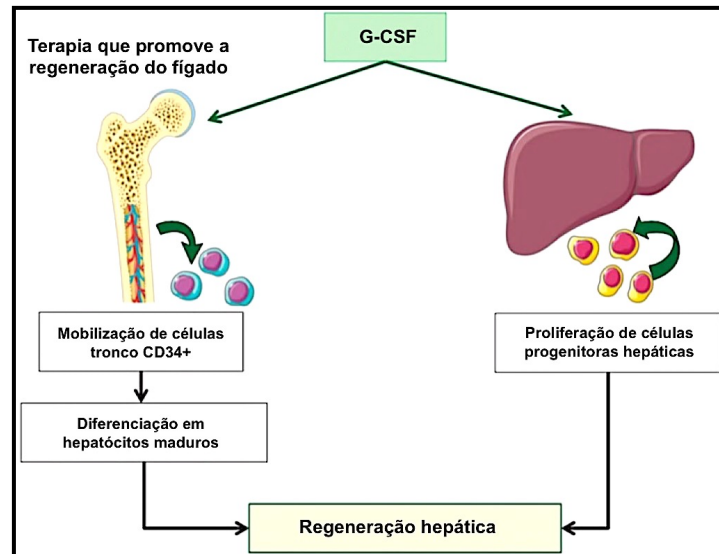
Nota: O receptor do GCS-F (G-CSFR) apresenta vias de sinalização que são ativadas em resposta à ligação do G-CSF, essas vias são a JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2, e a SOCS2 (que age como um regulador negativo de todas as vias) estas vias levam ao aumento da produção de granulócitos, sobretudo neutrófilos.

Legenda: G-CSFR-Receptor de GCS-F, JAK/STAT Janus tirosina quinase/Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição - PI3K/AKT-Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B, MAPK/ERK1/2- Proteína Quinase Ativadora de Mitógenos/ Quinase Reguladora de Sinal Extracelular, SOCS2- Supressor de Sinal de Citocina 2.

Estudos experimentais realizados em modelos de insuficiência hepática e hepatite demonstraram que a administração do G-CSF induz a mobilização de células tronco da medula óssea CD34⁺ que se diferenciam em hepatócitos. Além disso, a administração deste fator pode levar ao aumento do reparo hepático através da proliferação de células progenitoras hepáticas, que se diferenciam em hepatócitos maduros com consequente reparo do tecido lesado (figura 7). Em estudo clínico com humanos, em modelo de hepatite alcoólica e insuficiência hepática aguda-crônica, a injeção dessa citocina induziu a mobilização de células CD34⁺, expressão de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e a proliferação de células progenitoras hepáticas, além de melhorar os parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos dos pacientes (GUSTOT, 2014; MOREAU; RAUTOU, 2014; SINGH et al., 2018). Vários estudos clínicos tem demonstrado que o G-CSF promove a mobilização das células da medula óssea e aceleram o seu potencial de diferenciação,

atividade esta que foi evidenciada em estudo realizado em tecido cardíaco, no qual o G-CSF promoveu a diferenciação das células do tecido cardíaco em miócitos e em células vasculares. Além disso, foi observado o potencial desta citocina relacionado ao seu perfil anti-inflamatório em estudos realizados em modelo de colite ulcerativa e a doença de Crohn (OGISO et al., 2007).

Figura 7- Potencial mecanismo de ação do G-CSF na regeneração hepática.



Fonte: Adaptado de Moreau e Rauton (2014, tradução nossa).

Nota: O G-CSF age mediando a regeneração hepática através da mobilização de células tronco CD34+ e promovendo sua diferenciação em hepatócitos maduros, além de agir estimulando a proliferação de células progenitoras hepáticas no fígado lesionado.

Legenda: G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos

Em um estudo clínico de fase II realizado com pacientes acometidos com cirrose e um alto grau de insuficiência hepática, foi avaliado os efeitos da mobilização das células da medula pelo G-CSF, demonstrando resultados promissores como regeneração do órgão e sua função (SPAHR et al., 2008; SINGH et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que a administração desse fator após transplante hepático ectópico aumentou a taxa de regeneração tecidual e a mobilização das células provindas da medula óssea, aumentando também a diferenciação dos hepatócitos dentro do tecido acometido com a lesão (LI et al., 2010).

2.6 Células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas

A modificação genética é uma ferramenta bastante utilizada atualmente na área da

medicina regenerativa e molecular. Esta vem sendo uma opção interessante, pois possibilita a melhora do potencial terapêutico celular em direcionar determinados fatores ao alvo, em casos de terapias específicas como agentes anti câncer (GRIFFIN et al., 2010; SAGE et al., 2016). As modificações celulares podem ser realizadas sobretudo de maneira viral e não viral. As técnicas não virais não integram o DNA de interesse ao DNA da célula receptora, sendo mais seguro pois tem baixa imunogenicidade em relação aos métodos virais (GUL-ULUDAG et al., 2012). Os vetores virais são bastante utilizados, pois permitem que o gene de interesse seja integrado ao genoma das células receptoras, podendo ser eficiente por sua capacidade de infectar as células receptoras (NOWAKOWSKI et al., 2013; WYSE et al., 2014). Estas técnicas tem o objetivo de promover a indução da diferenciação de determinados tipos celulares e ainda promover expressão ou supressão ectópica (fora do seu local de origem) de determinados genes que podem induzir as células a expressar o fenótipo de interesse. A aquisição de maiores conhecimentos na área de biologia molecular e biotecnologia vem permitindo que as modificações das CTs possam ser realizadas com o objetivo de obter a funcionalidade e o destino específico (NOWAKOWSKI, 2013). A modificação das CTs tem sido uma prática bastante explorada por estas possuem a capacidade de expressar e secretar moléculas que são parte de sua atividade parácrina, e ter a possibilidade de aumentar a expressão de seus fatores de crescimento e citocinas, sendo uma alternativa viável para se alcançar resultados mais eficientes (HAIDER et al., 2011; NOWAKOWSKI, 2013).

A utilização de CTs como as CTMs geneticamente modificadas ainda é alvo de discussão devido a algumas limitações como sua baixa sobrevivência após a realização do transplante. Porém, várias estratégias tem sido estudadas na tentativa de melhorar a longevidade das células após o transplante no ambiente de destino, assim como um melhor e mais efetivo meio de implante (LI et al., 2016). Estudos têm demonstrado que o uso de CTMs em terapias contra o câncer é devido ao seu potencial de ser modificadas e permitir a eficiência na ação de “entrega” de genes específicos para a terapia com agentes anti-câncer. Devido a sua capacidade de serem atraídas pelo estroma celular do tumor, a terapia com as CTMs geneticamente modificadas permitem a liberação dos genes de interesse em múltiplos sítios tumorais (SAGE, 2016).

As CTMs tem surgido como uma das maiores fontes no uso das terapias celulares como em modelos de cardiopatias. Estas células vem sendo utilizadas na terapia com foco na regeneração e completo reparo do tecido cardíaco, após eventos de infarto do miocárdio,

além da recuperação das funções teciduais, visando promover a regeneração do tecido e consequente diminuição da área de cicatrização (HARE et al., 2014; HATZISTEGOR et al., 2010; HELDMAN et al., 2014; KARANTALIS et al., 2014; KULANDAVELU et al., 2017).

Nesse contexto, um estudo realizado por Chen e colaboradores (2017) demonstrou o potencial terapêutico das CTMs superexpressando a óxido nítrico endotelial sintase (eNOS/NOS3) para o tratamento da lesão cardíaca isquêmica em ratos. Foi observado que o implante dessas células superexpressando o gene eNOS na medula óssea dos animais promoveu a melhora do quadro de isquemia. Além disso, o transplante promoveu a redução da área do infarto, aumentou a densidade dos capilares e ainda promoveu a melhora de parâmetros hemodinâmicos (KULANDAVELU et al., 2017).

Em estudo utilizando modelos de fibrose hepática em ratos foram avaliados a eficácia terapêutica das CTMs derivadas de humano que superexpressavam de forma ectópica o HGF. Esse estudo mostrou que essas células que superexpressavam este fator foram capazes de reduzir o processo de fibrose por meio da diminuição de citocinas, que atuam de forma pró-fibrogênica e recuperou o equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores, mostrando a eficácia das CTMs geneticamente modificadas com esse fator na regeneração da fibrose hepática (KIM et al., 2014).

Mediante o contexto apresentado sobre o potencial das CTMs e seus efeitos significativos para o tratamento das mais diversas patologias, a hipótese deste trabalho é se as células tronco mesenquimais geneticamente modificadas para superexpressar o G-CSF potencializaria a atividade antifibrótica, assim como o papel regenerativo dessas células, a fim de agir como uma alternativa terapêutica para as doenças crônicas do fígado.

3 JUSTIFICATIVA

A fibrose hepática corresponde a uma formação de tecido de cicatrização em resposta ao dano crônico ao fígado. A deposição contínua de tecido fibroso modifica o funcionamento do órgão e pode evoluir para complicações mais severas que levam a falência do fígado. Um grande número de pacientes portadores de doenças hepáticas são assintomáticos, todavia com o aparecimento de sinais e sintomas ocorre uma perda na qualidade de vida dos indivíduos levando a um ônus pessoal e econômico. Os tratamentos existentes são limitados e por isso novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. Nesse contexto, as células-tronco na medicina regenerativa têm se demonstrado uma relevante ferramenta na melhora tecidual em doenças crônico-degenerativas oriundas de diferentes etiologias. Nos últimos anos, nosso laboratório vem desenvolvendo estudos envolvendo terapias celulares e lesões hepáticas, principalmente, em modelos experimentais. Os resultados obtidos nos estudos iniciais com células tronco obtidas da medula óssea demonstraram melhora tecidual e dos parâmetros bioquímicos nos animais após o uso da terapia celular tanto no modelo experimental químico quanto parasitário. Os bons resultados obtidos a partir desse trabalho e de outros estudos descritos na literatura possibilitou a realização no Hospital São Rafael na Bahia de dois trabalhos clínicos de fase I e II realizados em pacientes hepatopatas e que se encontravam em fila de transplante. Os resultados obtidos foram satisfatórios, onde o procedimento de infusão de células-tronco mononucleares de medula óssea mostrou-se seguro e exequível. Melhora das funções hepáticas desses pacientes após terapia também foi observada até 90 dias após infusão celular. O que nos levou a refletir sobre a necessidade de aprimoramento na terapia que fosse capaz de auxiliar o processo de reparo de forma mais permanente. Nesse contexto, pretendemos avaliar o potencial terapêutico e biotecnológico das células tronco mesenquimais modificadas geneticamente para superexpressar o fator estimulador de colônia de granulócitos (GCS-F). O GCS-F é uma glicoproteína que tem sido utilizado em terapias de doenças agudas e crônicas tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos. Dessa forma, pretendemos com o presente projeto indicar novas fontes terapêuticas seguras e que apresentem resultados mais duradouros em hepatopatias.

4 HIPÓTESE

A terapia com células tronco mesenquimais, geneticamente modificadas para superexpressar o G-CSF, tem efeitos anti-fibrosantes em modelo experimental de fibrose hepática.

5 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial terapêutico do transplante de CTMs transduzidas com G-CSF (CTM_G-CSF), em lesão hepática crônica, em modelo experimental de fibrose hepática resultante da infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

5.1 Objetivos específicos

- a) Caracterizar funcional e imunofenotipicamente as CTM_G-CSF;
- b) Avaliar os efeitos anti-fibrosantes da terapia com CTM_G-CSF;
- c) Analisar os efeitos imunomodulatórios das CTM_G-CSF.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

Principais procedimentos metodológicos utilizados para realização dos experimentos.

6.1 Cultivo das CTMs

Cultivo das CTMs utilizadas no estudo.

6.1.1 Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF (CTM_G-CSF)

As CTM_G-CSF foram cedidas pela Dra Milena Botelho Pereira Soares (FIOCRUZ-BA). A modificação genética das CTMs foi realizada por Gonçalves e colaboradores (2017), através da transdução com um vetor lentiviral baseado em HIV-1 (vetor incapaz de se replicar, sendo utilizado para inserção e expressão dos genes de interesse nas células alvos). A confirmação da produção do G-CSF pelas células transduzidas foi feita através do ensaio ELISA sanduíche (GONÇALVES et al., 2017) As CTM_G-CSF foram plaqueadas e cultivadas no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (IAM/FIOCRUZ-PE), em garrafas T25cm² com meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle Media completo (DMEM– suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Vitrocell–Embriolife, São Paulo, BRA), 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 U/ml /Streptomomicina 10.000 µg/ml–Gibco-Life Technologies, SP, BRA). As culturas de células foram mantidas em estufa à 37°C em 5% de CO₂ e umidade de 95%, sendo observadas ao microscópio invertido a cada 24 horas para avaliar o perfil de crescimento e morfologia. Após 72 horas do início da cultura, foi realizada a troca de meio para remoção das células não aderentes. Ao atingirem confluência entre 80-90%, realizou-se a passagem celular utilizando solução de 0,20% Tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e EDTA 0,02% (Invitrogen-Gibco[®], USA).

6.2 Caracterização funcional e imunofenotípica das CTMs

Caracterização das CTMs utilizadas no estudo por meio de diferenciação e imunofenotipagem.

6.2.1 Indução das diferenciações adipogênica e osteogênica das CTMs

Para caracterizar as células CTM_G-CSF e CTM MOCK (células que passaram pelo mesmo processo de modificação recebendo o plasmídeo vazio, não expressando o gene de interesse), foram cultivadas em placas de 24 poços, divididas em duas concentrações diferentes (1×10^5 e 3×10^5) e em dois grupos: grupos de diferenciação e grupo controle (protocolo adaptado de Secco et al., 2008). Durante 10 dias as células foram cultivadas com meio indutor de diferenciação adipogênica: DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico (Penicilina/Streptomicina), Indometacina $60 \mu\text{M}$, 3-isobutilmetilxantina $500 \mu\text{M}$, Dexametasona $1 \mu\text{M}$ e Insulina $5 \mu\text{g/ml}$ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e meio de diferenciação osteogênica: DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimótico (Penicilina/Streptomicina), Ascorbato-2-fosfato $50 \mu\text{M}$, β -Glicerofosfato $10 \mu\text{M}$ e Dexametasona $0,1 \mu\text{M}$ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). O grupo controle foi cultivado com meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico. Os meios foram trocados a cada 72 horas e as placas observadas a cada 3 dias. Ao final dos 10 dias, foi realizada a coloração com Oil Red O para confirmação da diferenciação adipogênica. Para isso, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, seguida de lavagem com água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. Logo após, as células, foram coradas com solução de Oil red O por 5 minutos e lavadas com água destilada, sendo visualizadas em microscópio invertido. Para confirmar a diferenciação osteogênica, as células foram submetidas ao método Von Kossa. Inicialmente, após retirado o meio, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos. Em seguida, foi adicionada a solução de nitrato de prata a 5% e incubado sob luz UV por 1 hora. Após lavagem em água destilada, foi acrescentada a solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. A seguir, foi feita a lavagem com água destilada e visualizada com o auxílio de um microscópio invertido.

6.2.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Aproximadamente 10^6 células (CTM_G-CSF e CTM MOCK) foram tripsinizadas e centrifugadas a $1000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Em seguida, foram realizadas a contagem celular e avaliação da viabilidade utilizando azul de trypan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), em microscópio óptico, com auxílio de câmara de Neubauer. Após lavagem em PBS-Wash (PBS contendo 0,5% de BSA e 1% de Azida sódica, $\text{pH}=7,2$), alíquotas de 10^6 células foram distribuídas em tubos de citometria e incubadas com os anticorpos, mantidas em temperatura

ambiente e ao abrigo da luz. Os anticorpos específicos, anti-mouse, são conjugados à ficoeritrina (PE), alofocianina (APC) ou Isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD34-PE, CD45-APC, CD14-FITC, CD44-PE, CD105-APC, CD73-PE, CD29-FITC e Ly6A/E(Sca-1)-FITC (BD Pharmigen, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Ao fim do experimento, as células foram lavadas e analisadas no citômetro de fluxo (FACS Calibur - Becton Dickson Immunocytometry Systems), na qual a estratégia de análise utilizada foi 20.000 eventos e os dados obtidos foram dispostos em formato de histograma.

6.3 Análise da expressão do G-CSF

Para analisar a expressão do gene G-CSF nas CTMs geneticamente modificadas, as células transduzidas foram cultivadas em meio DMEM e em seguida tripsinizadas utilizando a solução 0,20% de Tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e 0.02% de EDTA (Invitrogen-Gibco[®], USA). O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente trizol (Invitrogen), e 5 µg de RNA foram utilizados para sintetizar cDNA através GoScript[™] Reverse Transcription Mix, Oligo(dt) (Promega, USA). Para verificação da expressão do gene G-CSF, foi utilizado 100ng do cDNA, sendo a avaliação da expressão do gene constitutivo β-actina utilizada como controle endógeno. A análise foi feita por meio da PCR convencional. A sequência nucleotídica dos primers utilizados estão dispostas no quadro 1.

Quadro 1- Sequências de primers utilizados nas reações de RT-PCR convencional.

Primers	Sequências 5'-3'	Tamanho (pbs)
<i>h</i>GCS-F forward	CTGGCAGCAGATGGAAGAACT	133
<i>h</i>GCS-F reverse	AGGAAGCTCTGCAGATGGGA	
β-actina forward	CCGTAAGACCTCTATGCCAAC	99
β-actina reverse	AGGAGCCAGAGCAGTAATCT	

Fonte: O autor

Para amplificação do gene G-CSF foram utilizados seguintes reagentes: MgCl₂ (50mM), dNTPs (100mM), enzima *Taq* DNA Polymerase recombinant (5U/µl) (Invitrogen[®]), Primer GCS-F reverse and forward (100µM), tampão 10X *Taq* DNA Polymerase recombinant PCR Buffer, template cDNA (100 µM) e volume suficiente de água deionizada para completar 20 µl de reação. As condições utilizadas para amplificação deste gene estão

descritas no quadro 2. Em seguida, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com power SYBR® safe corante de gel 50bps (Life Technologies). Após a corrida eletroforética, o gel foi analisado através de transiluminador UV para visualização das bandas de DNA e fotografado com auxílio do programa e fotodocumentador LPIX image (Loccus Biotecnologia).

Quadro 2- Condições de ciclagem utilizadas na reação de PCR convencional.

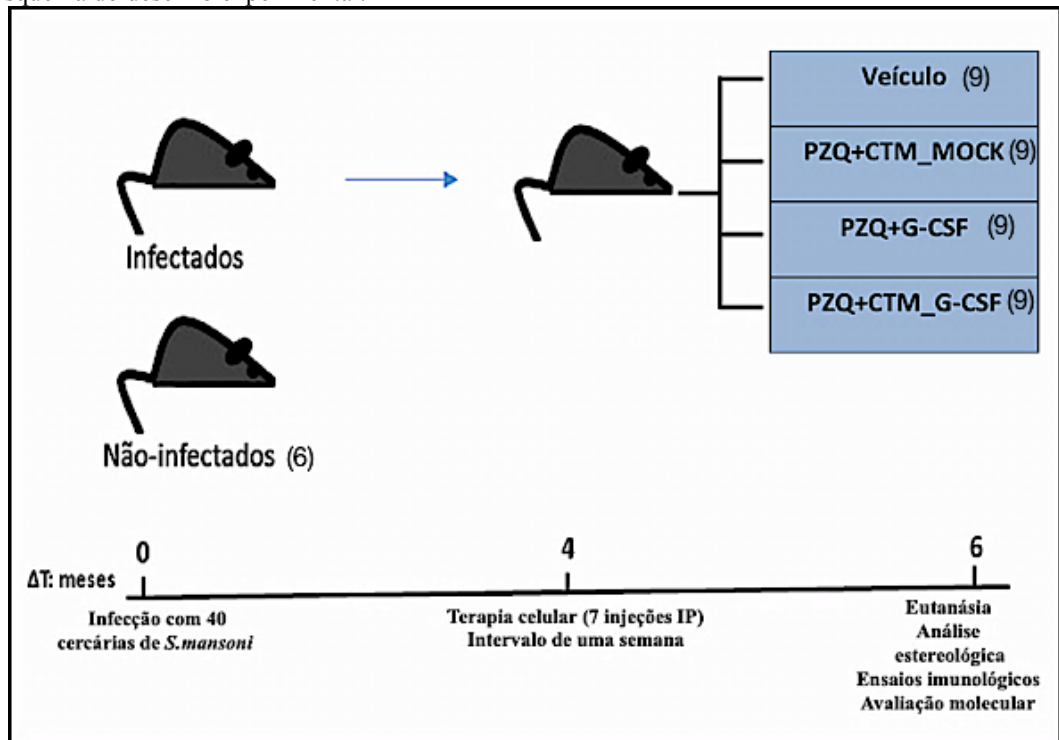
Condições de ciclagem		Temperaturas (°C)	Tempo (min)
Desnaturação inicial	} 35 ciclos	96	3,0
Anelamento		55	40,0
Extensão final		68	7,0

Fonte: O autor

6.4 Experimentação animal

Camundongos isogênicos C57BL/6 (n=42), do sexo feminino, foram obtidos do biotério de criação de animais do IAM/FIOCRUZ-Recife. Os animais foram mantidos no biotério experimental da referida instituição em condições ideais de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclos de 12h claro/escuro), recebendo água e dieta *ad libitum*. Para o estabelecimento do modelo murino de esquistossomose crônica, a infecção foi realizada por via transcutânea, com aproximadamente 40 cercárias de *S. mansoni* da cepa LE. Cerca de 45 dias após a infecção, foi realizado o exame parasitológico das fezes por meio do teste de Hoffmann para confirmação da infecção. Após o estabelecimento da fase crônica da infecção esquistossomótica (16 semanas), os animais foram submetidos ao tratamento quimioterápico com Praziquantel (dose única, via oral – 400mg/Kg) para a eliminação dos vermes adultos, no biotério de experimentação animal IAM/FIOCRUZ-Recife. Os animais infectados foram distribuídos randomicamente em quatro grupos experimentais com número entre 10 e 15 animais por grupo para a etapa seguinte do estudo (transplante celular). Um grupo de animais sem infecção também foi mantido e utilizado como controle negativo. Os animais foram submetidos à eutanásia 8 semanas após o início da terapia. O desenho experimental foi conduzido de acordo com o esquematizado na figura 8:

Figura 8- Esquema do desenho experimental.



Fonte: O autor.

Nota: Camundongos C57BL/6 foram utilizados para o estabelecimento dos modelo crônico de fibrose hepática. Estes animais foram submetidos a infecção pelo *S. mansoni*, e distribuídos em grupos randomicamente. Após 16 semanas da infecção, foram submetidos ao transplante celular. Depois de 8 semanas foi realizada a eutanásia para coleta de material de tecido hepático. Um grupo controle com animais saudáveis foi mantido durante todo o experimento.

Legenda: PZQ: Praziquantel, CTM MOCK: Células Tronco mesenquimais MOCK, G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos, CTM_G-CSF: Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF.

6.5 Transplante celular

Após 16 semanas da infecção pelo *S. mansoni* os animais infectados foram tratados com CTM_G-CSF, CTM MOCK e injeção direta do G-CSF e o veículo (solução salina). Esses animais receberam injeções de 10^6 células/animal via intraperitoneal, diluídas em solução salina (200 μ l), e foi adotado o intervalo de uma semana a cada injeção (durante sete semanas). O mesmo esquema de tratamento foi utilizado nos animais tratados com o veículo. Após 8 semanas do início da terapia, os camundongos foram submetidos à eutanásia para obtenção de amostras de fígado para a análise estereológica e hidroxiprolina.

6.6 Análise estereológica

Fragments de fígados dos animais utilizados no estudo, foram fixados em formol 10% por 24 horas, em seguida embebidos em parafina, seccionados (5 μ m) e corados pelo picrossírius vermelho e fast green para estudo do colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS;

BRENTANI, 1979). As imagens de secções histológicas coradas em picrosírius vermelho foram obtidas em microscópio óptico (DM LB 2, Leica Microsystems) equipado com uma câmera digital LEICA JVC TK (modelo C 1380, Pine Brook, NJ, EUA) e analisadas utilizando o sistema de processamento e análise de imagens LEICA QWIN, versão 2.6 MC (Leica, Cambridge, England). A partir das secções histológicas coradas com picrosírius vermelho e fast green, foram calculados alguns parâmetros de avaliação dos granulomas hepáticos como volume dos granulomas e densidades numérica (número de granulomas/unidade de volume) e volumétrica. As análises foram feitas em microscópio óptico (DM LB 2, Leica Microsystems).

6.7 Dosagem da hidroxiprolina

Amostras de fígado, obtidas do lobo maior, pesando entre 100 e 200 mg, foram usadas para determinação de hidroxiprolina, constituinte do colágeno. As amostras foram processadas e analisadas segundo a metodologia de Bergman e Loxley (1963), lidas em espectrofotômetro automático (Pharmacia, modelo Ultrospec 3000), em densidade óptica de 558 nm, para a obtenção dos valores de hidroxiprolina de cada amostra (nMol/mg).

6.8 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi feita com trizol (Invitrogen), a partir de fragmentos de tecido hepático (100mg). As amostras foram maceradas, seguidas da adição de 200µl de clorofórmio, para a separação do RNA dos demais componentes celulares (DNA e proteínas) em diferentes fases, etapa seguida de homogeneização por 15 minutos e centrifugação à 12.000x g, por 15 minutos a 15°C. A fase translúcida e aquosa (fase contendo o RNA) foi coletada e precipitada pela adição de 500 µl de álcool isopropílico, posteriormente foi acrescentado mais 500 µl de etanol 75%, a amostra foi centrifugada à 12.000xg por 10 minutos à 15°C e ressuspensa em água ultrapura livre de nucleases. Os RNAs extraídos foram em seguida tratados com água livre de RNase e DNase (Invitrogen). A concentração do RNA, bem como seu grau de pureza foram avaliados utilizando o aparelho NanoDrop 2000, disponibilizado pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM-FIOCRUZ. A síntese do cDNA foi realizada utilizando aproximadamente 5µg de RNA através do kit GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dt) (Promega, USA), seguindo as orientações do fabricante.

6.9 Estudos moleculares

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada no termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) usando power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A qPCR foi feita para avaliar os níveis de expressão de galectina-3, α -SMA e osteopontina (quadro 4). A amplificação do gene de β -actina foi utilizada como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com referência ao grupo de animais sadios e não tratados utilizando o método $\Delta\Delta$ CT pelo Software Applied Biosystems RQ.

Quadro 3- Sequências de primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

Primers	Sequências 5'-3'	Tamanho (pbs)
Galectina 3 forward	CTGAGAGATACCCATCGCTTTG	98
Galectina 3 reverse	GTAGCTCAGTGAGAGAACAACACT	
α-SMAforward	TCAGGGAGTAATGGTTGGAATG	112
α-SMAreverse	GGTGATGATGCCGTGTTCTA	
Osteopontina forward	CCTTGCTTGGGTTTGCAGTC	137
Osteopontina reverse	CAGTCACTTTCACCGGGAGG	
β-actina forward	CCGTAAGACCTCTATGCCAAC	99
β-actina reverse	AGGAGCCAGAGCAGTAATCT	

Fonte: O autor

6.10 Ensaio Imunológicos

Fragmentos hepáticos dos camundongos utilizados no estudo foram homogeneizados em um tampão de lise com inibidor de proteinases. Os sobrenadantes foram usados para quantificar através da técnica de ELISA sanduíche os níveis de IL-10 (e-Bioscience, San Diego, CA, USA), IL-13 (BD OptEIA set mouse, San Diego, CA, USA), TGF- β 1 (Human/mouse TGF-beta1, e-Bioscience, San Diego, CA, USA), MMP-9 e TIMP-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) de acordo com as orientações do fabricantes. As amostras foram lidas em um comprimento de onda de 450 nm através de um leitor de microplacas (modelo 3550, Thermo Scientific) as concentrações foram calculadas em pg/mL.

6.11 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram expressos em valores médios (média \pm EP). Inicialmente os dados quantitativos foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk). De acordo com o valor de p, os dados foram avaliados através do teste ANOVA, para análises paramétricas, ou não paramétrico (Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, USA). O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6.12 Considerações Éticas

Os experimentos com animais no presente trabalho estão de acordo com as normas éticas estabelecidas na FIOCRUZ-PE e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 108/2016 (Anexo A).

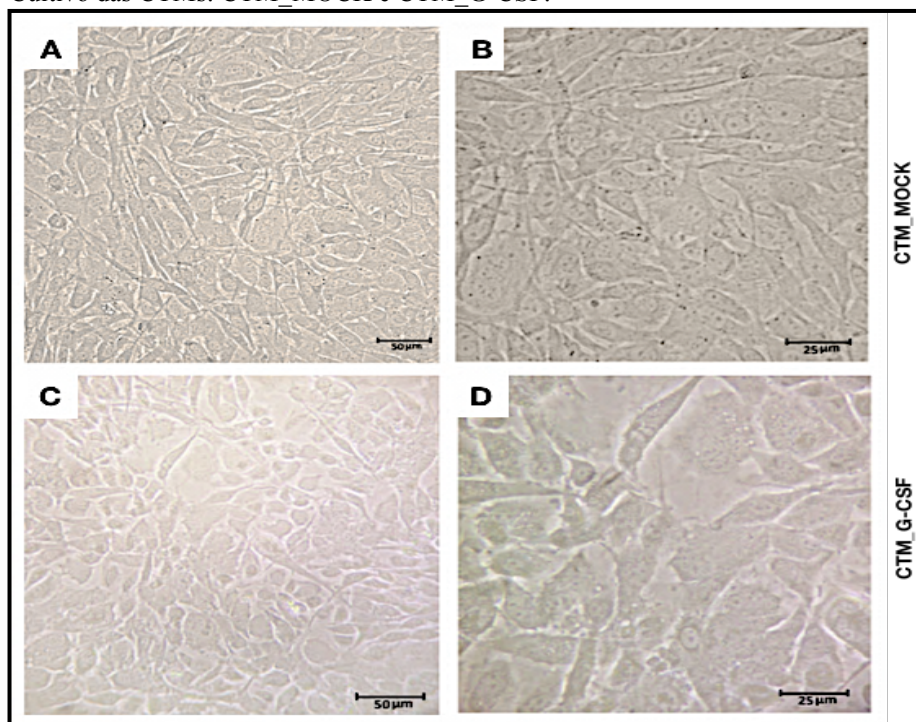
7 RESULTADOS

Principais resultados alcançados.

7.1 Cultivo das CTMs

As CTMs transduzidas ou não com o G-CSF foram mantidas em ambiente condicionado (estufa contendo 5% CO₂ e temperatura de 37°C), iniciaram a aderência e apresentaram aspectos fibroblatóides nas primeiras 24 horas. Durante os 3 primeiros dias, as células permaneceram aderentes na garrafa de cultura celular (T25cm²). Em aproximadamente dez dias de cultivo, as CTMs atingiram 90% de confluência, o que pode ser observado pela análise morfológica e observação diária em microscópio óptico invertido (Figuras 9A, 9B, 9C e 9D).

Figura 9- Cultivo das CTMs: CTM MOCK e CTM G-CSF.



Fonte: O autor

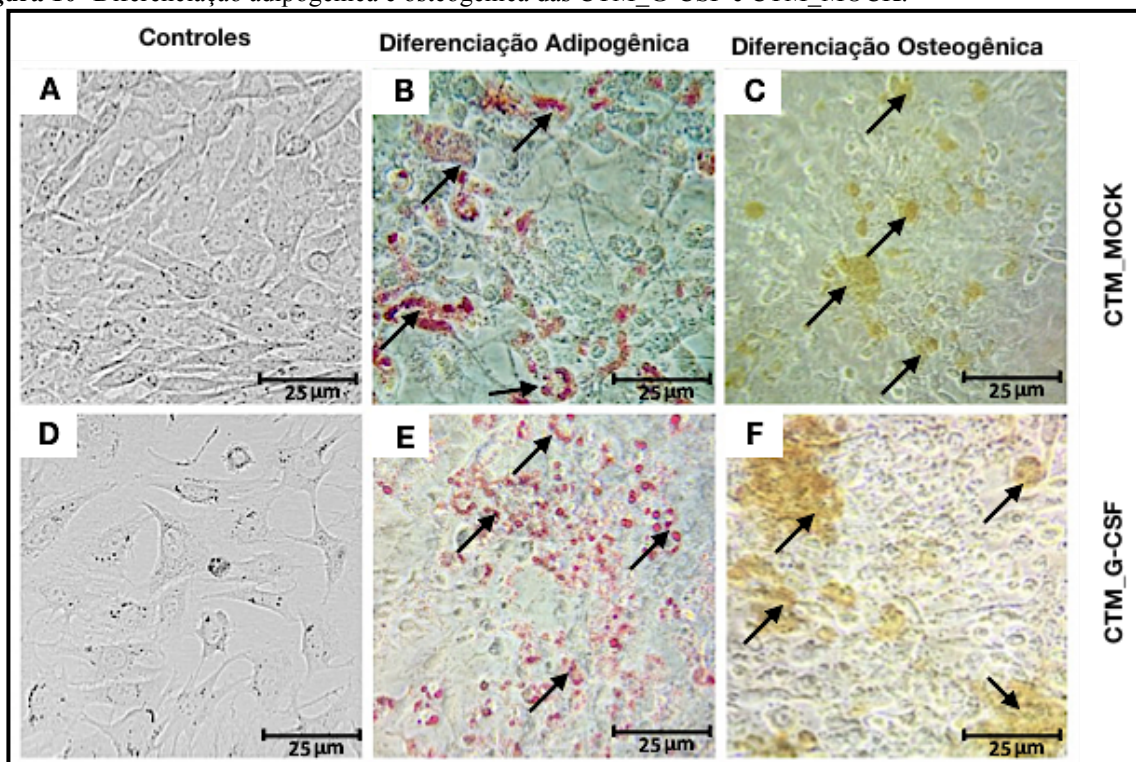
Nota: Por microscopia óptica de contraste de fase, é possível observar as CTMs MOCK (A e B) e CTMs G-CSF (C e D) com aproximadamente uma semana de cultivo e confluentes, apresentando morfologia fibroblastoide, aspecto alongado e aderentes à superfícies plástica, em diferentes aumentos (A-C: escala 50 μm B-D: escala 25 μm).

Legenda: CTM_G-CSF: Célula tronco mesenquimal transduzidas com G-CSF;
CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK.

7.2 Evidenciação do potencial de diferenciação celular

As CTMs (CTMs MOCK e CTMs G-CSF) submetidas à diferenciação adipogênica e osteogênica apresentaram após 10 dias de cultivo em meio de diferenciação, alterações morfológicas com presença de gotículas lipídicas em seu interior (figuras 10B e 10E), enquanto nos poços controles as células mantiveram a morfologia fibroblastoide sem presença de sinais de diferenciação (figuras 10A e 10D). Na placa de diferenciação osteogênica, também com cerca de 10 dias de cultivo, foi possível se observar pequenas estruturas de coloração escurecida agrupadas, sendo um indicativo de depósitos de matriz mineral, figuras 10C e 10F.

Figura 10- Diferenciação adipogênica e osteogênica das CTM_G-CSF e CTM MOCK.



Fonte: O autor

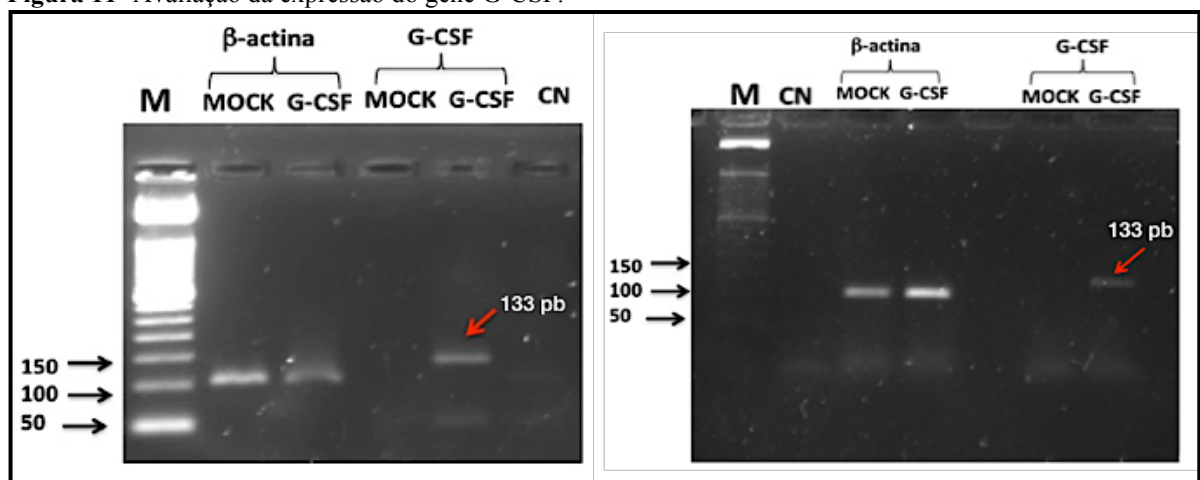
Nota: Em A e D é possível observar as CTMs MOCK e CTMs G-CSF cultivadas sem o meio indutor de diferenciação (escala de 25 µm); em B e E evidenciam-se gotículas de lipídios intracelulares das CTMs MOCK e CTMs G-CSF, respectivamente (setas pretas), após o processo de diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O (escala de 25 µm). Em C e F podem ser observados os depósitos de matriz mineral das CTMs MOCK e CTMs G-CSF, respectivamente (setas pretas), corado pelo método de Von Kossa (escala de 25µm).

Legenda: CTM_G-CSF: Célula tronco mesenquimal transduzidas com G-CSF; CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK.

7.3 Análise da expressão do gene G-CSF

A avaliação da expressão gênica foi realizada nas CTMs_G-CSF. Os resultados demonstraram que as CTMs_G-CSF apresentaram acentuada expressão do gene de interesse, em comparação com as células controle (CTMs MOCK) (figura 11). O tamanho da banda do gene de interesse foi de acordo com o esperado, 133 bps. A expressão nas CTMs_G-CSF foi observada tanto antes quanto depois da realização do transplante celular nos animais.

Figura 11- Avaliação da expressão do gene G-CSF.



Fonte: O autor

Nota: A amplificação do gene G-CSF confirmada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, na qual os fragmento da banda apresentou o tamanho correspondente ao gene de interesse (setas vermelhas) quando comparado com o marcador 50 bp.

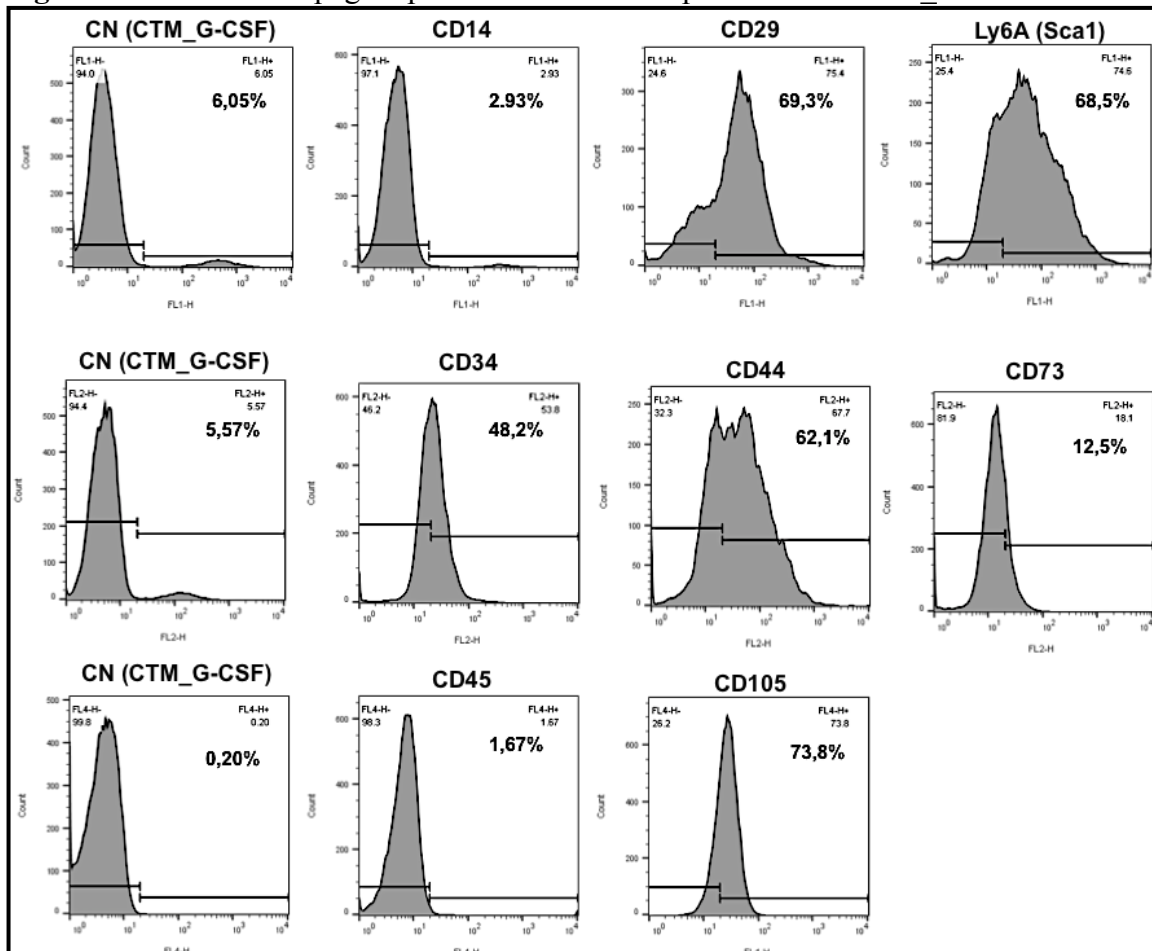
Legenda: M: ladder; CN: controle negativo; CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK; G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos.

7.4 Caracterização imunofenotípica das CTMs

As CTMs (MOCK e G-CSF), foram submetidas à avaliação da expressão de moléculas de superfície celular que são consideradas características para a referida linhagem em estudo através da citometria de fluxo. Para os anticorpos utilizados, as CTMs_G-CSF (figura 12), apresentaram marcação positiva para os seguintes antígenos de superfície: CD29 (69,3%), Ly6A (Sca-1) (68,5%), CD44 (62,1%), CD 73 (12,5%), CD105 (73,8%) e CD34 (48,2%), e percentuais considerados negativos para os antígenos de superfície: CD14 (2,93%), e CD45 (1,67%). Para as CTMs MOCK (figura 13), foram observadas positividade para os seguintes antígenos de superfícies: CD29 (99,0%), Ly6A (Sca-1) (77,8%), CD44 (99,5%), CD73 (28,8%) e CD34 (87,8%), e e negatividade para os

antígenos: CD14 (0,43%), CD45 (0,79%) e CD105 (3,19)%. As células sem marcação, utilizadas como controles negativos, também serviram de parâmetro para análise da expressão positiva ou negativa dos marcadores com seus respectivos fluorocromos conjugados, sendo avaliados de acordo com o deslocamento do histograma relacionado ao canal de leitura.

Figura 12- Imunofenotipagem para macadores de superfície das CTMs_G-CSF.

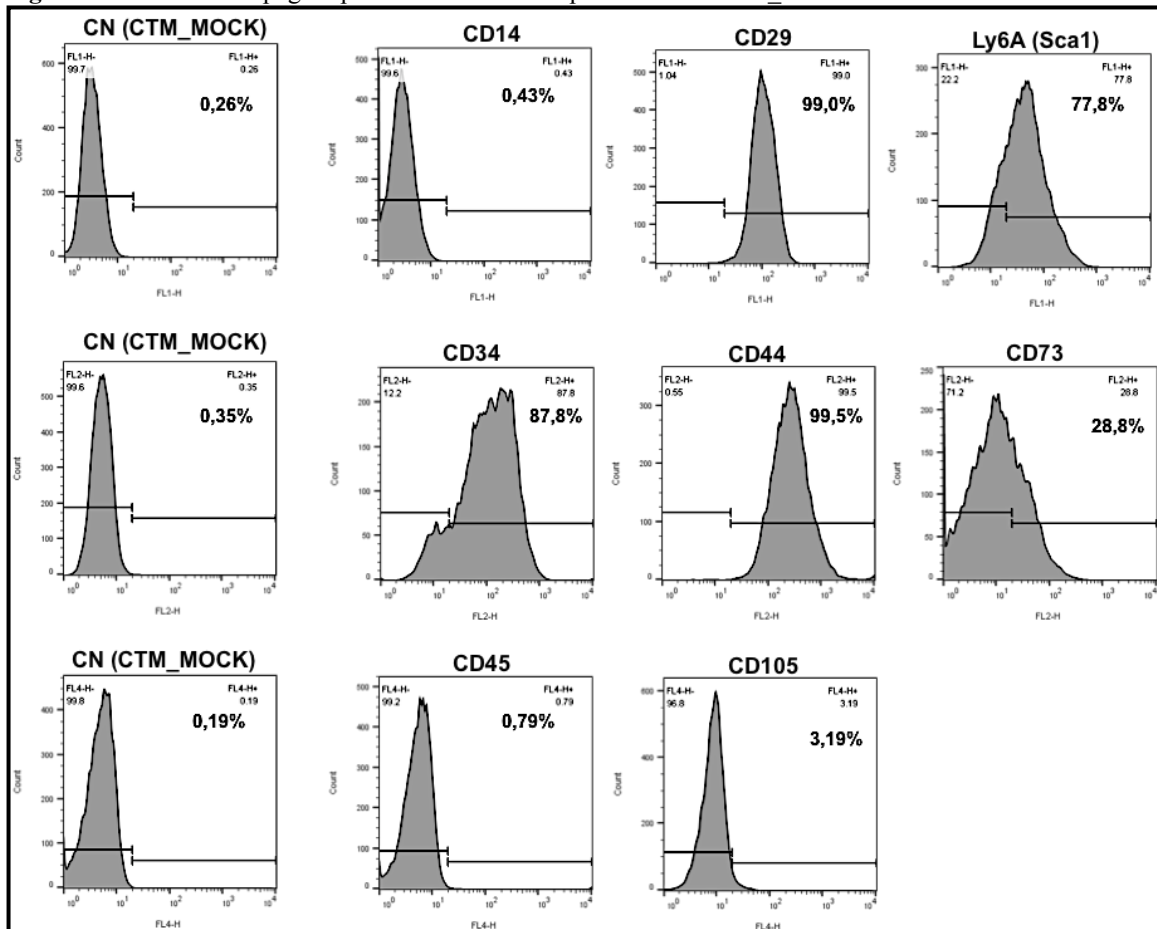


Fonte: O autor

Nota: Imunofenotipagem através da identificação e quantificação de antígenos de superfície das CTMs_G-CSF, por meio de citometria de fluxo. CN (CTM_G-CSF): células sem marcação utilizadas como padrão negativo para a expressão dos marcadores avaliados. Histogramas dos marcadores apresentam suas respectivas porcentagens de acordo com as células marcadas como positivas ou negativas em relação ao canal de leitura do respectivo fluorocromo.

Legenda: CN: Controle negativo; CTMs_G-CSF -Célula Tronco Mesenquimal transduzidas com G-CSF.

Figura 13- Imunofenotipagem para marcadores de superfície das CTMs MOCK.



Fonte: O autor.

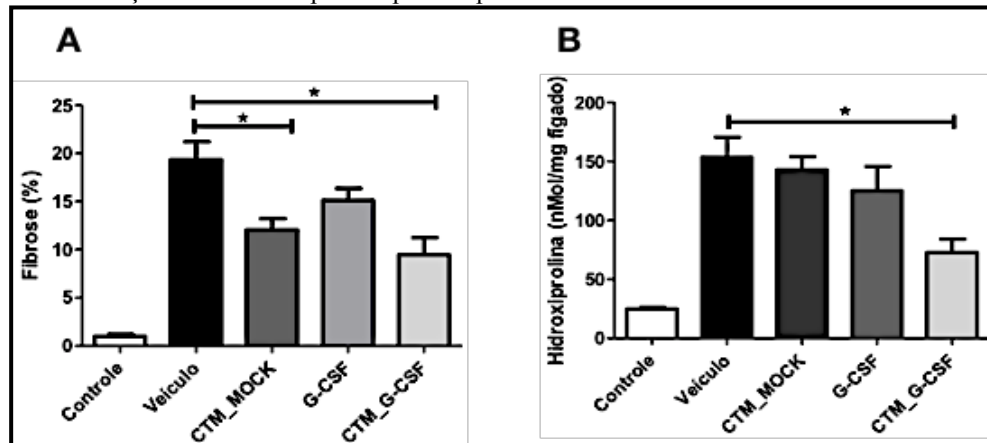
Nota: Imunofenotipagem através da identificação e quantificação de antígenos de superfície na CTMs MOCK por meio de citometria de fluxo. CN (CTM MOCK): células sem marcação utilizadas como padrão negativo para a expressão dos marcadores avaliados. Histogramas dos marcadores apresentam suas respectivas porcentagens de acordo com as células marcadas como positivas ou negativas em relação ao canal de leitura do respectivo fluorocromo.

Legenda: CN: Controle negativo; CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK.

7.5 Avaliação da fibrose hepática

A avaliação dos percentuais de tecido fibroso foi realizada através da análise estereológica. Os resultados demonstraram que houve diminuição significativa ($A=p<0,03$; $B=p<0,03$), do percentual de tecido fibroso entre os grupos de camundongos esquistossomóticos submetidos à terapia com as CTMs MOCK e CTM_G-CSF quando comparados ao grupos sem tratamento. Os animais tratados com G-CSF recombinante apresentaram uma redução não significativa do percentual de tecido fibroso (Figura 14A). Por sua vez, a análise bioquímica da hidroxiprolina no tecido hepático demonstrou uma diferença significativa estatisticamente apenas entre os grupos de animais tratados com as CTMs_G-CSF (figura 14 B).

Figura 14- Avaliação da fibrose hepática após terapia celular com as CTMs.



Fonte: O autor

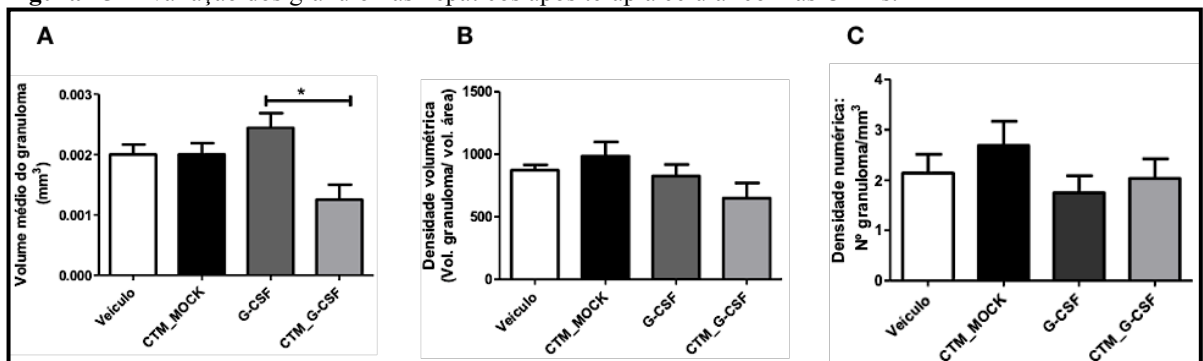
Nota: Quantificação de tecido fibroso realizado por meio da análise estereológica em animais tratados com o veículo (salina), CTMs MOCK, G-CSF recombinante e CTM_G-CSF (A), análise da hidroxiprolina (B). Análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A=*P<0,03; B=*P<0,03).

Legenda: CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK; G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos; CTM_G-CSF: Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF.

7.6 Avaliação dos granulomas hepáticos

Para avaliação dos granulomas hepáticos foram levados em consideração o volume médio e densidades volumétrica e numérica. Os resultados demonstraram que a terapia celular promoveu uma diminuição significativa estatisticamente para o volume dos granulomas nos animais tratados com as CTMs_G-CSF. Quanto às densidades dos granulomas, não foram alteradas para os grupos submetidos à terapia celular nem com as CTMs nem com o G-CSF recombinante (figuras 15A, 15B e 15C).

Figura 15- Avaliação dos granulomas hepáticos após terapia celular com as CTMs.



Fonte: O autor

Nota: Mensuração do volume médio (A), densidade volumétrica (B) e densidade numérica (C) dos granulomas hepáticos nos animais tratados com o veículo (salina), CTM MOCK, G-CSF recombinante e com as CTM_G-CSF. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A=*P<0,03; B=P<0,2; C=P<0,5).

Legenda: CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK; G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos; CTM_G-CSF: Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF.

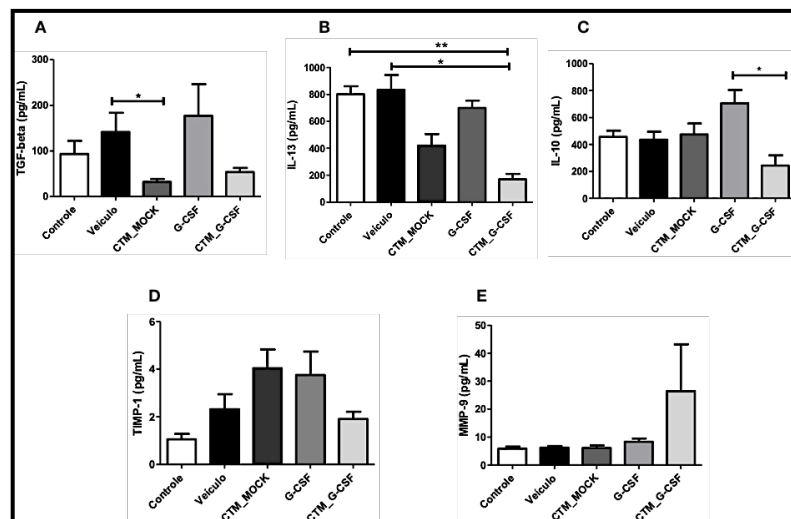
7.7 Análises imunológicas

Principais marcadores imunológicos analisados no estudo.

7.7.1 Análise do perfil de citocinas

Após terapia com CTMs MOCK foi possível observar níveis estatisticamente reduzidos de TGF- β , citocina relacionada à deposição de fibrose (figura 16A). Essa tendência também foi verificada nos grupos tratados com as CTMs_G-CSF. Todavia, o grupo tratado apenas com G-CSF recombinante não foi observado nenhuma alteração (figura 16A). Ao avaliarmos a concentração da IL-13, outra citocina fibrogênica, foi possível observar alterações significativas sobretudo nos grupos tratados com as CTMs_G-CSF, quando comparado com o grupo sem infecção ou tratado apenas com o veículo (figura 16B). Além disso, foram analisados os níveis hepáticos de IL-10, o qual apresentou uma diminuição significativa estatisticamente para o grupo tratado com as CTMs_G-CSF, em relação ao grupo tratado com o G-CSF recombinante (figura 16C). Não se observou diferenças entre os níveis de TIMP-1 (figura 16D) e MMP-9 entre os grupos avaliados (figura 16E).

Figura 16- Efeitos da terapia celular com as CTMs no perfil hepático dos mediadores e fatores reguladores da fibrose hepática.



Fonte: O autor

Nota: Níveis hepáticos de TGF- β 1 (A), IL-13 (B), IL-10 (C), TIMP-1 (D) e MMP-9 (E) mensurados por ELISA sanduíche nos animais controles e tratados com veículo (salina), CTM MOCK, GCS-F recombinante e CTM_G-CSF. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A=*P<0,03; B**=P<0,02;*P<0,02; C=P<0,02; D=P<0,3; E=P<0,05).

Legenda: CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK; G-CSF: Fator estimulador de

colônia de granulócitos; CTM_G-CSF: Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF.

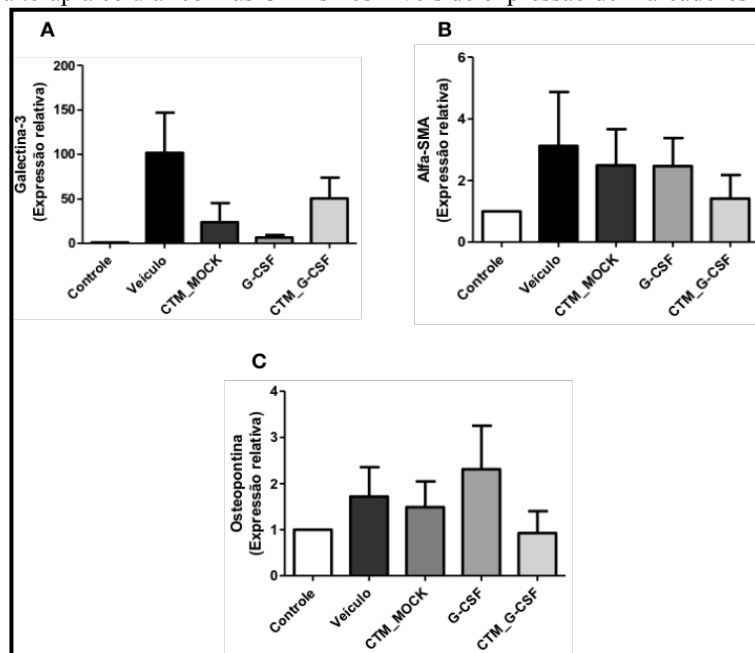
7.8 Análises moleculares

Principais marcadores moleculares analisados no estudo.

7.8.1 Análise da expressão gênica

No presente estudo, os estudos moleculares não indicaram mudanças significativas no perfil de expressão gênica de galectina 3 (figura 17 A), α -SMA (figura 17 B) e osteopontina (figura 17 C) em nenhum dos tratamentos testados.

Figura 17- Efeitos da terapia celular com as CTMs nos níveis de expressão de marcadores da fibrose hepática.



Fonte: O autor

Nota: Análise de expressão gênica de (A) Galectina-3, (B) α -SMA, (C) Osteopontina mensurados por ELISA sanduíche nos animais controles e tratados com veículo (salina), CTMs MOCK, GCS-F recombinante e CTMs_G-CSF. As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-hoc de Dunn (A= $P < 0,05$; B= $P < 0,6$; C= $P < 0,7$).

Legenda: CTM MOCK: Células tronco mesenquimais MOCK; G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos; CTM_G-CSF: Células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF.

8 DISCUSSÃO

O uso da terapia celular tem aberto muitas perspectivas no âmbito da medicina regenerativa. A terapia celular utilizando sobretudo células tronco vem sendo utilizada no tratamento de diversas doenças a exemplo das doenças hepáticas crônicas (ABDEL AZIZ et al., 2007). Todavia, além de seus efeitos benéficos não serem permanentes (GAGE, 2013), algumas populações celulares, a exemplo das CTMs, apresentam desempenho limitado do potencial terapêutico (SHI; LI, 2008). As CTMs são fortes candidatas ao uso na clínica por suas importantes características imunorregulatórias e capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares (HE et al., 2018; WANG et al., 2018). Nesse sentido, com o intuito de potencializar suas ações e permanência no tecido com lesão, aventou-se a utilização da engenharia genética a fim de aumentar a sobrevivência dessas células após o transplante (CLÉMENT et al., 2017; NOWAKOSWKI et al., 2009; WAGNER et al., 2009). Sendo maneira, o presente estudo objetivou avaliar o papel das CTMs transduzidas com o G-CSF em modelo crônico de lesão hepática, resultante da infecção pelo *Schistosoma mansoni*. A infecção por esse parasito caracteriza-se pela formação de granulomas isolados e fibrose periportal. Dessa forma, podemos avaliar o processo de reparo hepático após terapia celular.

As CTMs_G-CSF utilizadas no presente estudo apresentaram características semelhantes às descritas por Fridenstein et al. (1966) demonstrando que estas células apresentam aderentes ao plástico e que em cultura crescem em monocamada apresentando morfologia fibroblastoide (ALFAIFI et al., 2018; FERNANDEZ; FERNANDEZ, 2016; WANG et al., 2018).

Antes do início dos trabalhos serem realizados com as CTM_G-CSF, foi necessário confirmar a expressão do gene de interesse, o qual demonstrou superexpresso nas células modificadas corroborando Gonçalves et al. (2017), ao modificar estas células. Esta confirmação foi realizada tanto antes quanto depois do transplante nos animais infectados, demonstrando que as células não deixaram de expressar o gene durante os procedimentos de terapia.

A plasticidade foi verificada e confirmada nas CTMs transduzidas ou não com o G-CSF, apresentando algumas características funcionais e morfológicas que foram estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) (BYDLOWSKI et al., 2009; MENDICINO et al., 2014). A plasticidade através do seu potencial de diferenciação em células das linhagens adipogênicas e osteogênicas quando mantidas sob condições de cultura foi confirmada no presente estudo (ALFAIFI et al., 2018; GRONTHOS, et al.,

2003). De acordo com Pittenger et al. (1999), quando mantidas em cultura, o meio de cultivo influencia diretamente no processo de diferenciação celular, o que foi observado em nosso estudo.

Nosso estudo corrobora os resultados encontrados por Birmingham et al. (2012), que relatou que a introdução de fatores indutores de diferenciação osteogênica como ácido ascorbico, dexametasona e β -glicerol fosfato no meio das CTMs tem influência direta no processo de diferenciação celular. Nossos resultados também demonstraram os mesmos que foram encontrados em estudos prévios realizados por Lu et al. (2011) e Ilmer colaboradores (2009), os quais reportaram que o processo de diferenciação osteogênica é influenciado com a introdução de fatores indutores ao meio de cultivo, dados que também foram observados por Wang et al. (2007) e Heino e outros (2004) em seus estudos. Quanto à diferenciação adipogênica, Scott et al. (2011) relataram que há uma certa heterogeneidade quanto aos suplementos indutores nesta diferenciação, assim como as suas concentrações a serem utilizadas, porém em nosso estudo tanto os suplementos quanto suas respectivas concentrações inseridas no meio foram suficientes para induzir o processo de diferenciação das CTMs em células semelhantes a adipócitos.

Além dos critérios de plasticidade, a SITC estabeleceu alguns critérios fenotípicos para caracterizar uma população de CTMs (DOMINICI et al., 2006, MENDICINO et al., 2014; VARMA et al., 2007). Devido a observação na expressão de vários antígenos de superfícies presentes na maioria das CTMs, foi estabelecido um consenso que define um painel de marcadores que são característicos desta linhagem celular. Mesmo apresentando variabilidade apenas alguns deles são de fato utilizados para tal finalidade, pois caracterizar essa linhagem celular de acordo com essas moléculas de superfície tem dividido a opinião de vários autores devido a variação nos seus níveis de expressão (MENDICINO et al., 2014; MITCHELL et al., 2006).

De acordo com a SITC, os marcadores positivos mais utilizados para a caracterização de CTMs derivadas de humanos são CD73, CD90, CD105 e CD166, porém não se limitando apenas a estes. Além disso, estas células não expressam os marcadores CD11, CD14, CD33, CD34 e CD45, devendo apresentar-se negativas quando marcadas fenotipicamente (DOCHEVA et al., 2008; DOMINICI et al., 2006; JACKSON et al., 2007). Devido a falta de conservação desses marcadores entre as espécies, se faz necessário a utilização de um painel de marcadores mais específicos para células derivadas de murinos, devendo apresentar positividade para os marcadores como o CD29, CD44, CD73, CD105, CD140a, Sca-1 e MHC-I e negatividade para os marcadores CD31, CD34, CD45, CD19, CD11b e

MHC-II (BADDOO et al., 2003; BOIRET et al., 2005; CHEN et al., 2016; SAMSONRAJ et al., 2017; VIZOSO et al., 2017).

No presente estudo realizamos a imunofenotipagem com o objetivo de caracterizar as células que superexpressam ou não o G-CSF. Utilizamos como marcadores positivos o CD29, CD44, CD73, CD105 e Sca-1, e como marcadores negativos o CD34, CD14 e CD45 de acordo com estabelecido pela SITC. Para as células CTM_G-CSF foi observado positividade para a maioria dos marcadores considerados positivos os quais apresentaram mais de 60% das células marcadas, porém para um destes marcadores, o CD73, foi observado um número de células abaixo de 60%, sendo apenas cerca de 12% das células marcadas. De acordo com Peister et al. (2004) e Boxal e outros (2012), a expressão do CD73 em alguns casos estão ausentes ou de forma bastante heterogênea. Uma das causas para esta baixa expressão pode ser devido a alta passagem celular que faz com o que a expressão de alguns marcadores diminua à medida que são expandidas em cultura (LIN et al., 2012). Uma das moléculas consideradas de grande importância para diferenciar as CTMs das CTHs é o CD45, uma glicoproteína específica de células do sistema hematopoético como os leucócitos (YEH et al., 2006). Esta molécula demonstrou mais de 98% de negatividade nas células do nosso estudo.

Além disso, para os marcadores considerados negativos foram observados resultados dentro do esperado, demonstrando que mais de 90% das células marcadas foram negativas. Entretanto, observou-se uma marcação positiva para a molécula CD34 nas CTMs transduzidas ou não com o G-CSF. Apesar de ser considerado como um marcador negativo para a população de CTMs, este tem dividido a opinião de diversos autores que buscam comprovar a existência de uma população de CTMs CD34 positivas (CD34+), assim como uma população de CTHs CD34 negativas (CD34-) (LIN et al., 2012; SYDNEY et al., 2014). Nossos resultados corroboram com os resultados encontrados por Simmons e Torok-Storb (1991), que também encontraram positividade para o CD34 em seu estudo, com uma população de CTMs derivadas da medula óssea, demonstrando que das células analisadas cerca de 95% foram CD34 positivas (CD34+). Porém, de acordo com alguns autores a negatividade para o CD34 pode estar relacionado às condições das células no ambiente de cultura (STOLZING et al., 2012). Apesar disso, ainda há uma grande inconsistência nos dados relacionados à expressão do CD34 nas CTMs. É possível que esse fenômeno de expressão do CD34 pelas CTM não seja um processo totalmente induzido pela condição de cultura, pois alguns autores ainda acreditam que essa população celular quando isolada pode

não ser estabelecida uma cultura totalmente pura de CTMs. (BIANCO et al., 2001; DOCHEVA et al., 2008).

Para as CTM MOCK, utilizamos os mesmos marcadores já supracitados. Os resultados observados para estas células foram dentro do esperado para a maioria dos marcadores considerados positivos, com mais de 77% das células marcadas, porém estas apresentaram negatividade para o CD105, o qual é definido como um dos marcadores positivo para tal população celular. O CD105 é considerado um correceptor de alta afinidade para o TGF- β 1 e o TGF- β 3 e que, apesar de ser considerado um importante marcador para as CTMs, alguns estudos têm relatado que sua expressão está relacionada com a fonte de extração, tempo de cultura *in vitro* e estado de diferenciação dessas células (ANDERSON et al., 2013). Segundo Levi et al. (2011), a ausência desse marcador (CD105-) também pode estar relacionada com seu estado de diferenciação, com um maior potencial de se diferenciar em células da linhagem osteogênica. No estudo realizado por Anderson et al. (2013), foi definido que existem duas subpopulações de CTMs, as que expressam o CD105 e as que não o expressam (CD105+ e CD105-). Neste estudo, Anderson e outros demonstraram que apesar de apresentar algumas características semelhantes, as CTMs CD105 negativas apresentam uma maior facilidade de se diferenciar em células da linhagem adipogênica e osteogênica, quando submetidas à diferenciação *in vitro*.

Adicionalmente, em nosso estudo, foi analisado o quadro de fibrose hepática nos animais após a terapia com as CTMs. A extensão do quadro de fibrose foi determinada pela análise estereológica quantitativa do colágeno através da coloração feita com picrossírius em seções de tecidos nas áreas dos granulomas. Os resultados revelaram uma diminuição significativa no conteúdo de colágeno tanto na análise estereológica quanto na análise da hidroxiprolina nos grupos analisados depois do tratamento com as CTMs, sobretudo nos animais tratados com as CTMs G-CSF. Os nossos resultados são semelhantes aos resultados encontrados por Oliveira et al. (2012) e por Hegab e outros (2018) que sugeriram que o uso de CTMs associadas ao praziquantel, como realizado em nosso estudo, pode ser utilizado como tratamento a fim de melhorar o quadro de fibrose hepática causada pelo *S. mansoni*.

O estudo de Hegab e outros (2018) também demonstrou que o tratamento com CTMs derivadas de medula óssea conseguiu alcançar as áreas granulomatosas. Nossos resultados foram semelhantes ao supracitado ao observarmos uma diminuição do volume dos granulomas nos animais tratados com as CTMs GCSF. Essa redução constatada em nosso

estudo, após o transplante das CTMs, pode ser explicada por seus efeitos imunomodulatórios e/ou está relacionada com um número reduzido de CEHs ativadas. Vários autores já tem relatado o processo de fibrose em modelo murino e a ativação de CEHs (JIANG et al., 2013; NIETO et al., 2002; POLI et al., 2000; TROEGER et al., 2012).

A dosagem de citocinas como marcadores da fibrose hepática tem sido avaliada em vários estudos, porém demonstrando conflitos nos resultados apresentados (OLVEDA et al., 2014). O TGF- β é definido com um dos principais estímulos que promovem a produção de MEC pelas CEHs (OLVEDA et al., 2014). Além disso, esta citocina é um fator que contribui para o desenvolvimento do quadro de fibrose periportal na infecção causada pelo *S. mansoni*. Em nosso estudo, foi observado que a concentração dos níveis desta citocina foi diminuída nos animais submetidos ao tratamento com as CTMs. Nossos resultados são semelhantes aos observados por Jang et al. (2014), que constatou que houve diminuição de TGF- β e outras citocinas pro-fibrogênicas após o transplante de CTMs derivadas de medula óssea em modelo de cirrose hepática. O TGF- β é uma citocina que regula a produção de TIMP, logo sua diminuição pode contribuir para a regulação da expressão do TIMP-1 diminuindo-o e conseqüentemente aumentando as metaloproteinases que causam degradação da MEC (ABDEL-AZIZ, 2007).

Outras citocinas também são capazes de regular a resposta imune durante a infecção crônica pelo *S. mansoni*. (MAGALHÃES et al., 2004). Em modelos murinos, a IL-13 tem papel importante durante a formação do granuloma, assim como o desenvolvimento do processo de fibrose hepática (CHIARAMONTE et al., 2001; MÔNICA et al., 2003). Nossos resultados demonstraram que nos animais tratados com as células CTM_G-CSF houve uma diminuição significativa nos níveis de IL-13, mostrando que possivelmente houve uma regulação na produção desta citocina influenciando assim na diminuição do processo fibrótico e formação do granuloma. No estudo realizado por Magalhães et al. (2004) foi observado que quando bloqueado o receptor de IL-13 em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, estes animais tiveram o quadro de fibrose tecidual quase totalmente anulados. Este resultado demonstra que quando ligada ao seu receptor a IL-13 desempenha um papel fundamental no processo de desenvolvimento do quadro de fibrose hepática e do granuloma durante a fase crônica da infecção.

Além disso, a IL-10 também é uma das citocinas que exerce papel importante na modulação da resposta imune, que regula a ativação de macrófagos, expressão de MHC-I e

II e também reduz células de resposta Th1 e Th2. (DE WALL-MALEFYT et al. 1993). Estudos como os de Hoffmann e outros (2000) e Wang e outros (2018) demonstraram que a IL-10 desempenha papel importante na redução da patologia da esquistossomose na fase aguda. A análise da concentração de IL-10 realizada em nosso estudo demonstrou que houve um aumento significativo desta citocina no grupo tratado com o G-CSF recombinante, quando comparado com o grupo tratado com as CTM_G-CSF. A concentração de IL-10 no grupo tratado com as CTMs MOCK não sofreu nenhuma alteração quando comparado com os demais grupos estudados, porém no grupo tratado com as CTM_G-CSF foi observado uma diminuição significativa desta citocina. Nosso resultado assemelha-se com o encontrado por Fernandez-Martinez et al. (2006), em estudo realizado com modelo de cirrose hepática, no qual foi observada uma redução da concentração de IL-10, indicando que isto pode ser devido aos seus efeitos antifibrótico e anti-inflamatório não serem tão eficientes e capazes de diminuir o quadro de fibrose em seu estado mais severo, agindo apenas modulando a fase anterior à progressão deste processo.

Outras citocinas também estão envolvidas nesse processo de regulação do quadro fibrótico como o TIMP-1. O TIMP-1 é o primeiro inibidor de metaloproteinase descoberto e que atua no bloqueio da ação de collagenases e metaloproteinases como a MMP-9 (NIE et al., 2006), regulando assim o remodelamento da MEC no fígado. O TIMP-1 é expresso em resposta ao dano causado nos hepatócitos como consequência da interação entre os miofibroblastos ativados e células de Kupffer (macrófagos hepáticos). Além disso, tem sido relatado que o TIMP-1 está fortemente aumentado no tecido hepático e no soro tanto de pacientes quanto de animais durante a fibrogênese hepática, sendo sua expressão relacionada diretamente com o estágio da fibrose hepática (DE MINICIS et al., 2007; HEMMANN et al., 2007; LICHTINGHAGEN et al., 2013). Durante a fibrose hepática, há um aumento da expressão de TIMP, inibindo apoptose da CEHs (HEMMAN et al., 2007; METWALLY et al., 2017). Estudos experimentais em modelo de fibrose hepática induzido pelo CCL₄ tem relatado que a supressão ou inibição do TIMP-1 atenua o processo de fibrose hepática (PARSONS et al., 2004; RODERFELD et al., 2006). Em nosso estudo, a análise da concentração de TIMP-1 em animais tratados com CTMs não demonstraram alterações significativas, apresentando um aumento da sua concentração nos animais tratados com CTMs MOCK e uma tendência à diminuição no grupo tratado com as CTMs_G-CSF, podendo indicar um possível efeito dessas células sobre a produção desta citocina. Nesse contexto, um estudo realizado por Thiele et al. (2016) avaliou a influência do TIMP-1 no

desenvolvimento da fibrose hepática e mostraram que não houve uma contribuição essencial do TIMP-1 no desenvolvimento desta doença.

As metaloproteinases são proteínas capazes de degradar componentes da MEC, sendo divididas em cinco grupos, de acordo com sua especificidade ao substrato da MEC: colagenases, gelatinases, tipo membrana, estromelinas e matrilisinas (BOURBOULIA et al., 2010; GROSS; LAPIERE, 1962; KESSENBROCK et al., 2010). As células de Kupffer são uma das principais células a produzir MMPs, sobretudo a MMP-9, uma das principais metaloproteinases que contribuem para o processo de resolução do quadro de fibrose hepática (FALLOWFIELD et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2012). A MMP-9 tem sido descrita por desempenhar um papel importante em vários processos de danos hepáticos (MA et al., 2010). Um estudo realizado por Feng et al. (2018), em modelo animal de fibrose hepática induzido por tioacetamida, demonstrou que a MMP-9 desempenha um papel importante na degradação da MEC durante o processo de regressão da fibrose. No presente estudo, a análise dos níveis hepáticos de MMP-9 nos animais submetidos ao tratamento com as CTMs não apresentaram diferença significativas, mas sim uma tendência de aumento no grupo tratado com as CTM_G-CSF. Tais resultados podem ser justificados levando em consideração que outras MMPs podem estar participando mais ativamente do processo de degradação de tecido cicatricial. Dentre elas, pode-se citar a MMP-1, que atua na regulação da degradação da MEC atenuando o quadro de fibrose; a MMP-8, associada a uma redução de processos fibróticos, sobretudo em modelos experimentais de danos hepáticos; MMP-13 e a MMP-14 que estão expressas durante o processo de regeneração hepática em modelo murino (FALLOWFIELD et al., 2017; ROEB, 2017). Nesse contexto, a diminuição no quadro de fibrose observada em nosso estudo pode estar associada a qualquer outro tipo de MMPs das supracitadas, não envolvendo assim a participação ativa da MMP-9.

O estudo molecular foi realizado com o objetivo de verificar o perfil de expressão dos genes relacionados à citocinas que estão envolvidas no processo de fibrose hepática. Foram avaliados os níveis de expressão dos genes de galectina 3 (Gal-3), alfa actina de músculo liso (α -SMA) e osteopontina (OPN). A gal-3 é uma proteína que está aumentada em lesões hepáticas crônicas murina e humana (BAYES-GENIS et al., 2014; LOK et al., 2010; MACKINNON et al., 2012; YU et al., 2013). O presente estudo demonstrou que houve uma tendência à diminuição dos níveis de expressão relativa de gal-3 nos grupos tratados com as CTMs, o que pode estar relacionada com a ação dessas células nos locais de lesão após o seu transplante.

Em estudo realizado por Oliveira et al. (2012), verificou-se uma diminuição bastante significativa de gal-3 após o transplante de células da medula óssea em modelo animal de cirrose hepática, evidenciando o papel desta citocina no desenvolvimento desta doença. Com relação à análise dos níveis de expressão gênica de α -SMA e osteopontina, foi possível observar uma tendência à diminuição, sobretudo no grupo tratado com as CTM_G-CSF. A α -SMA é uma proteína que está relacionada com as CEHs, aumentando seus níveis quando estas células encontram-se ativadas. (CORDERO-ESPINOZA; HUCH, 2018). Em um estudo realizado por Jang et al. (2014), observou-se melhora do quadro de fibrose hepática através da diminuição dos níveis de expressão de α -SMA, TGF- β 1 e colágeno-1 após o tratamento com CTMs derivadas da medula óssea. A osteopontina é uma proteína que está envolvida em diversas situações patológicas e processos inflamatórios, estando associada com a migração de macrófagos e neutrófilos até áreas de necrose do tecido hepático (SAMMY et al., 2015; WEN et al., 2016). Lee e outros (2004) em seu estudo descreveram que a osteopontina induz proliferação e migração das CEHs, além da produção de colágeno por estas células, demonstrando que a OPN tem um papel importante na fibrogênese hepática. Lee e outros ainda indicaram que uma das possíveis alternativas terapêuticas para a fibrose, seria interromper a expressão da OPN, levando assim a uma melhora do quadro de lesão hepática.

9 CONCLUSÕES

- a) A caracterização funcional e imunofenotípica das CTMs demonstraram resultados pertinentes e semelhantes aos já estabelecidos na literatura para a linhagem em estudo;
- b) A terapia com células tronco mesenquimais transduzidas com G-CSF na infecção crônica pelo *S. mansoni* mostrou-se mais efetiva que a terapia apenas com as CTMs, sendo capaz de reduzir o percentual de tecido fibroso com diminuição da produção de citocinas pró fibrogênicas como a IL-13;
- c) A análise do perfil de expressão gênica, não apresentou nenhuma alteração significativa para os genes considerados importantes para o desenvolvimento da fibrose hepática como Galectina-3, α -SMA, e osteopontina.

REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIZ, M. T. et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. **Clin. Bioch.**, Toronto, v. 40, n. 12, p. 893-899, 2007.
- ADSUMILLI, A.; RAO, R.; KROTHAPALLI, S. R. The clinical applications of hematopoietic growth factor-G-CSF. **A. J. Biomed. Pharmac. Scienc.**, Guntur, v. 2, n. 14, p. 1-10, 2012.
- ALFAIFI, M. et al. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. **J. Hepatol.**, Copehnagen, v. 68, p.1272–1285, 2018.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. K. Effects of matrix metalloproteinases on the fate of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Res. Ther.**, London, v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612636>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- ALWASH, S. M., RASHIDI, H., HAY, D. C. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? **Cel. Mol. Life. Sci.**, Edinburgh, v. 75, p.1307–1324, 2017.
- ANDERSON, P. et al. CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n.10, 2013. Disponível em:< <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076979> >. Acesso em: 20 jan. 2019.
- AVALOS, B. R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood**, New York, v. 88, n. 3, p. 761-777, 1996.
- BADDOO, M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **J. Cell. Biochem.**, New York, v. 89, p. 1235-1249, 2003.
- BALOGH, P., ENGELMANN, P. **Transdifferentiation and regenerative medicine**. 2011. Disponível em: <https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Transdifferentiation_en_book/ch01s04.html>. Acesso em: 2 jan. 2019.
- BALDASSARI, L. E., COHEN, J. A. Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitor Cells in Progressive Multiple Sclerosis: Great Expectations. **EBioMed.**, Cleveland, v. 29, p. 5-6, 2018.
- BATALLER, R., BRENNER, D. A. Liver fibrosis, **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BAYES- GENIS, A. Head-to-head comparison of 2 myocardial fibrosis biomarkers for long-term heart failure risk stratification: ST2 versus galectin-3. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 63, p.158–166, 2014.

- BERNARDIS, S. et al. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: Current situation and future prospects. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 21, n. 3, p. 742-758, 2015.
- BIANCO, P. et al. Convergence of gene and cell therapy. **Stem. Cells.**, Durham, v. 414, n. 6859, p. 118-121, 2001.
- BISWAS, S., SHARMA, S. Hepatic Fibrosis and its Regression: The Pursuit of Treatment. **J. Liv. Res. Disord. Therap.**, New Delhi, v. 2, n. 2, p. 3-4, 2016.
- BIRMINGHAM, G.L. et al. Osteogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **Eur. Cell. Mater.**, Glasgow, v. 23, p. 13-27, 2012.
- BHARTIYA, D. Stem cells to replace or regenerate the diabetic pancreas: Huge potential & existing hurdles. **Ind. J. Med. Res.**, Mumbai, v. 143, p. 267-274, 2016.
- BOBIS, S., JAROCHA, D., MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Fol. Histochem. Cyt.**, Cracow, v. 44, n. 4, p. 215-230, 2006.
- BOIRET, N. et al. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 3, p. 219-225, 2005.
- BONGSO, A., RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best. Prac. Res. clin. Obst. Gynaecol.**, Amsterdam, v.18, n.6, p. 827-842, 2004.
- BOEKER, K. H. et al. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. **Clin. Chim. Acta**, Liverpool, v. 316, p.71-81, 2002.
- BOULTON, R.A. et al. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. **JHepatol**, Copehnagen, v. 29, p. 271–280, 1998.
- BOULTON, R. et al. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1a and -1b: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. **Hepat.**, London, v. 26, p. 49–58, 1997.
- BOURBOULIA, D., STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin. Cancer. Biol.**, London, v.20, p.161–168, 2010.
- BOXALL, S. A., Jones, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. **Stem. Cells. Int.**, Leeds, v. 2012, n. 2012, 2012.
- BOZKAYA, O. I. et al. The Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on Immune-Modulatory Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment and Mesenchymal Stem Cells of Healthy Donors. **Biol. Blood. Mar. Transp.**, Ankara, v. 21, p. 1888-1894, 2015.

BUSSOLINO, F. et al. Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate, **Nature**, London, v. 337, n. 6206, p. 471-473, 1989.

BYDŁOWSKI, S.P. et al. características biológicas das células tronco mesenquimais. **R. Bras. Hemat. Hemot.**, São Paulo, v. 31, p. 25-35, 2009.

CETEAN, S. et al. The importance of the granulocyte stimulating factor in oncology. **Clujul. Med.**, Cluj-Napoca, v. 88, n. 4, p. 468-472, 2015.

CHAGASTELLES, P. C., NARDI, N. B. Biology of stem cells: an overview. **Kid. Inter. Suppl.**, Porto Alegre, v. 1, p. 63-67, 2011.

CHANGE, C. B. et al. Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers. **Osteoart. Cart.**, London, v. 21, p. 190-199, 2012.

CHAVEZ-TAPIA, N. C. et al. Granulocyte-colony stimulator factor for acute on chronic liver failure: systematic review and meta analysis. **Ann. hepatol.**, Mexico City, v. 14, n. 5, p. 631-641, 2015.

CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell. Death Differ.**, London, v. 23, p. 1128–1139, 2016.

CHEN, L., TREDGET, E. E. LIU, C., WU, Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, p.1-7, 2009.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatol.**, Baltimore, v. 34, p. 273-282, 2001.

CLÉMENT, F. et al. Stem cell manipulation, gene therapy and risk of cancer stem cell emergence. **Stem. Cell. Investig.**, Lyon, v. 4, p.67, 2017.

CORDERO-ESPINOZA, L., HUCH, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 128, n. 1, p. 85–96, 2018.

DELORME, B. et al. The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties. **Stem. Cell. Develop.**, Larchmont, v.19, p. 853–866, 2010.

DEL CARLO, R.J. et al. Avanços no estudo de células tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres**, Viçosa, v.56, n. 4, p. 446-450, 2009.

DE MINICIS, S. et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and *in vivo*. **Gastroenterol.**, Baltimore, v. 132, p. 1937–1946, 2007

DENNIS, J. E. et al. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. **C. Tis. Org.**, Villejuif, v.170, p.73-82, 2002.

- DEOTARE, U. et al. G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept. **Bone Marrow Transplant.**, Basingstoke, v. 50, p. 150-1156, 2015.
- DE UGARTE, D. A. et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v. 89, p. 267–270, 2003.
- DEVINE, S. M., HOFFMAN, R. Role of mesenchymal stem cell in hematopoietic stem cell transplantation. **Curr. Opin. Hematol.**, Philadelphia, v. 7, p. 358-363, 2000.
- DE WALL-MALEFYT, H.R. et al. L-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II MHC expression. **J. Exp. Med.**, New York, v. 174, p. 915-924, 1993.
- DOCHEVA, D. et al. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors. **Curr Rheumatol. Rev.**, Nussbaumstr, v. 4, n. 3, p. 1-6, 2008.
- DOMEN, J., WAGERS, A., WEISSMAN, I. L. Bone Marrow (Hematopoietic) **S. C. Bethesda**, Maryland, 2016, p. 13-34.
- DOMICINI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Oxford, v. 8, p. 315–317, 2006.
- DUARTE, S. et al. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. **MatrixBiol.**, Los Angeles, p. 147–156, 2015.
- DUFFIELD, J. S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **An. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, Seattle, v.8, p.241-276, 2013.
- DWIVEDI, P., GREIS, K. D. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia, and related malignancies. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 46, p. 9–20, 2017.
- EBRAHIMI, H., NADERIAN, M., SOHRABPOUR, A. A. New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. **Middle East J. Dig. Dis.**, Tehran, v.8 n.3, p. 166-178, 2016.
- EOM, Y. W., KIM, G., BAIK, S. K. Mesenchymal stem cell therapy for cirrhosis: Present and future perspectives. **World J. Gastroenterol.**, Wonju, v. 21, p.10253-10261, 2015.
- FALCÃO, P.L. et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation, **Par. Immunol.**, Belo Horizonte, v. 20, p. 447–454, 1998
- FALLOWFIELD, J. A. et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 178, p. 5288-5295, 2007.

- FARZEI, M. H. et al. Curcumin in Liver Diseases: A Systematic Review of the Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Clinical Perspective. **Nutrients.**, Basel, v. 10, p. 855, 2018.
- FAUSTO, N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells and stem cells. **Hepatol.**, Baltimore, v. 39, p. 1477-87, 2004.
- FENG, M. et al. Kupffer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to liver fibrosis resolution. **Int. J. Biol. Sci.**, Nanjing, v. 14, n. 9, p. 1033- 1040, 2018.
- FERNANDEZ, T. S; FERNANDEZ, C. S. Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic. Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications for Haematopoietic Stem Cell Transplantation. **InTech**, p. 496-519, 2016.
- FERNÁNDEZ-MARTINEZ, E. et al. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. **Exp. Toxicol. Pathol.**, Jena, v. 58, p. 49-58, 2006.
- FERRER, J. R., CHOKECHANACHAISAKUL, A., WERTHEIM, J. A. New Tools in Experimental Cellular Therapy for the Treatment of Liver Diseases. **Current. Transplant. Rep.**, Evanston, v. 1, n. 2, p. 202–210, 2015.
- FIORE, E. J., MANZZOLINI, G., AQUINO, J. B. Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: Recent findings, old/new caveats and future perspectives. **Stem. Cell. Rev.**, Totowa, v. 11, n. 4, p. 586-597, 2015.
- FORBES, S. J., ROSENTHAL, N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. **Nat. Med.**, New York, v. 20 n. 8, p. 857-869, 2014
- FORBES, S. J. Stem cell therapy for chronic liver disease choosing the right tools for the job. **Gut.**, New York, v. 57, p. 153–155, 2008.
- FORBES, S. J., NEWSOME, P. N. New horizons for stem cell therapy in liver disease. **J. Hepatol.**, New York, v. 56, p.496-499, 2012.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis, **Gastroenterol.**, Baltimore, v. 134, n. 6, p. 1655–1669, 2008.
- FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, U., KALUGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 4, p. 267-274, 1976.
- FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, Cambridge, v. 16, 381–390, 1966.
- GAGE, F. H. Transplantation in the future. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. **Prog. Brain. Res.**, Hamburg, v. 200, p. 7-13, 2013.
- GAZDIC, M., et al. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases. **Int. J. Biol. Sci.**, Sofia, v. 13, p. 1109-1117, 2017.

GILGENKRANTZ, H.; L'HORTET, A. C. Understanding Liver Regeneration From Mechanisms to Regenerative Medicine. **Amer. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 188, n. 6, p. 1316-1327, 2018.

GOH, Y. P. et al. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. **PNAS**, Washington, v. 110, p. 9914–9919, 2013.

GONÇALVES, G. V. M. Generation and characterization of transgenic mouse mesenchymal stem cell lines expressing hIGF-1 or hG-CSF. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 70, 577–591, 2018.

GOUNDER, S. S. et al. Adult Stem Cell Therapy in Liver Cirrhosis Management: Current Practices and Future Perspectives. **Int. J. Stem. Cell. Res. Ther.**, Dordrecht, v. 4, n. 49, p. 1-10, 2017.

GRIFFIN, M et al. Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells and Their Clinical Potential in Acute Cardiovascular Disease. **Disc. Med.**, Timonium, v. 9, n. 46, p. 219-223, 2010.

GRONTHOS, S., et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. **J C Sci**, London, v. 116, p. 1827-1835, 2003.

GROSS, J., LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **PNAS**, Washington, v. 48, p. 1014-1022, 1962.

GUL-ULUDAG, H. et al. Cationic liposome-mediated CXCR4 gene delivery into hematopoietic stem/progenitor cells: implications for clinical transplantation and gene therapy. **Stem. Cell. Dev.**, Larchmont, v. 21, n. 10, p. 1587–1596, 2012.

GUMUCIO, J. J. et al. Structural and Functional Organization of the Liver. In: **Liver and Biliary Diseases**, 2nd Edition, Ed. Kaplowitz, Williams & Wilkins, 1996, p. 3-19.

GUSTOT, T. Beneficial role of G-CSF in Acute-on-Chronic Liver Failure: effects on liver regeneration, inflammation/immunoparalysis or both? **Liver Int.**, Oxford, v. 34, p. 484–486, 2014.

HAGA, J., ENOSAWA, S., KOBAYASHI, E. Cell Therapy for Liver Disease Using Bioimaging Rats. **Cell Med.**, Elmsford, v. 9, p. 3–7, 2016.

HAIDER, H. K. et al. Genetic Modification of Stem Cells for Improved Therapy of the Infarcted Myocardium. **Mol. Pharm.**, Cincinnati. v. 8, p. 1446-1457, 2011.

HARE, J. M. et al. Randomized Comparison of Allogeneic Vs. Autologous Mesenchymal Stem Cells for Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 69, n. 5, 526-37, 2017.

HARE, J. M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 54, n. 24, p. 2277–86, 2009.

- HATZISTERGOR, K. E. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 2010, n. 7, p. 913–22, 2017.
- HE, Y. et al. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. **S. C. Res. Ther.**, London, v. 9, n. 263, 2018.
- HEINO, T. J. et al. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. **Exp. Cell. Res.**, New York, v. 294, n. 2, p. 458-468, 2004.
- HEGAB, M. H. et al. Therapeutic potential effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chronic liver disease in murine Schistosomiasis Mansonii. **J. Parasit. Dis.**, Lucknow, 2018
- HELDMAN, A. W. et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. **JAMA**, Chicago, v. 311, n. 1, p. 62–73, 2014.
- HEMMANN, S, et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **J. Hepatol.**, Copenhagen, v. 46, p. 955–975, 2007.
- HERNANDEZ-GEA, V., FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annu. Rev. Pathol.**, Palo Alto, v. 6, p. 425–56, 2011.
- HERNÁNDEZ-AQUINO, E., MURIEL, P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 24, n. 16, p. 1679-1707.
- HOFFMANN, K. F. et al. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, p. 6406, 2000.
- HONG, I. H. et al. JNK1 and JNK2 regulate alpha-SMA in hepatic stellate cells during CCl4-induced brosis in the rat liver. **Pathol. Int.**, Mumbai, v. 63, p. 483-91, 2013.
- HOOGDUIJN, M. J., BETJES, M. G., BAAN, C. C. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: Different sources and unique characteristics? **Curr. Opin. Organ. Transplant.**, Philadelphia, v. 19, p. 41-46, 2014.
- HUA, J., Y. U. et al. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. **Tissue Cell**, Edinburgh, v.41, p. 448–455, 2009.
- HUEBERT, R. C., RAKELA, J. Cellular Therapy for Liver Disease. **May Clin. Proc.**, Rochester, v. 89, n. 3, p. 414–424, 2014.
- HY, L., JU, D. et al. Activation of TGF-beta1-CD147 positive feedback loop in hepatic stellate cells promotes liver brosis. **Sci. Rep.**, London, v. 5, 2015.

ILMER, M. et al. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng. Part A**, New Rochelle, v. 15, n. 9, p. 2397-2409, 2009.

JACKSON, L. et al. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. **J. Postgrad. Med.**, Bombay, v. 53, n. 2, 2007.

JANG, Y. O. et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model. **BMC Gastroenterol.**, London, v.14, n.198, p. 1-12, 2014.

JANG, Y.O. et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. **Liver Int.**, Oxford, v. 34, p. 33-41, 2014.

JIANG, Z., HAN, Y., CAO, X. Induced pluripotent stem cell (iPSCs) and their application in immunotherapy. **Cell Mol. Immunol.**, Beijing, v. 11, p. 17–24, 2014.

KARANTALIS, V. et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: the prospective randomized study of mesenchymal stem cell therapy in patients undergoing cardiac surgery (PROMETHEUS) trial. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 114, n. 8, p. 1302–1310, 2014.

KARANTALIS, V., HARE, J. M. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 116, n. 8, p. 1413-30, 2015.

KESSENBROCK, K. et al. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, Cambridge, v.141, p. 52–67, 2010.

KHOLODENKO, I. V. & KOSNSTATIN, N. Y. Cellular Mechanisms of Liver Regeneration and Cell-Based Therapies of Liver Diseases. **Biomed. Res. Internat.**, New York, v. 2017, p. 1-17, 2016.

KILIAN, K. A. et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. **PNAS**, Washington, v.107, n. 11, p. 4872–4877, 2010.

KIM, M. D. et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. **Exp. Mol. Med.**, Seoul, v. 46, n. 8, p.1-10, 2014.

KIRBY, G. T. S. et al. Stem cells for cutaneous wound healing. **BioMed. Resear. Internat.**, New York, v. 2015, 2015.

KOCABAYOGLU, P. et al. beta-PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates brosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. **J. Hepatol.**, New York, v. 63, p.141-7, 2015.

KOMORI, A., MIGITA, K. Liver architecture, cell function, and disease. **Sem. Immunop.**, London, v. 31, n. 3, p. 399-409, 2009.

KOPP, J. L., GROMPE, M., SANDER, M. Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. **Nat. Cell Biol.**, London, v. 18 n. 3, 2016.

KOPPULA, P. R. et al. Histocompatibility testing of cultivated human bone marrow stromal cells-A promising step towards pre-clinical screening for allogeneic stem cell therapy. **Cell Immunol.**, New York, v. 259, p. 61–65, 2009.

KOT-BAKIERA, K. et al., Hepatic stellate cells activation and liver fibrosis after chronic administration of ethanol. **Curr. Issues. Pharm. Med. Sci.**, Lublin, v. 29, n. 2, p. 66-70, 2017.

KULANDAVELU, S., BALKAN, W., HARE, J. M. Next Generation Stem Cell Therapy: Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Repair. **Cardiovasc. Drugs. Ther.**, Norwell, v. 31, p. 5-7, 2017.

KULANDAVELU, S. et al. Pim1 kinase overexpression enhances ckit + Cardiac stem cell cardiac repair following myocardial infarction in swine. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 68, n. 22, p. 2454-64, 2016.

LAKSHMIPATHY, U., VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Rev.**, Edinburgh, v. 19, p. 29–38, 2005.

LEE, U. E., FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v. 25, n. 2, p. 195–206, 2012.

LEE, Y.A., WALLACE, M.C., FRIEDMAN, S. L. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. **Rec. adv. Bas. Scien.**, New York, p.1-12, 2015.

LEE, J. I. et al. Role of Smad3 in Platelet-Derived Growth Factor- C induced liver brosis. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, Seoul, v. 15, n. 310, p.436-45, 2016.

LEE, S. H. et al. Effects and regulation of osteopontin in rat hepatic stellate cells. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 68, p. 2367–2378, 2004.

LEMOINNE, S. et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 1832, n. 7, p. 948–954, 2013.

LEVI, B. et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 286, n. 45, p. 39497-509, 2011.

LIANG, J. et al. Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases. **Int. J. Rheum. Dis.**, Nanjing, 2017.

LI, L. et al. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? **S. C. Internat.**, Chongqing, v. 2016, 2016.

- LIN., ZHANG, L., LI, H., FANG, B. Human CD34⁺ cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor ameliorates radiation-induced liver damage in mice. **S. C. Res. Ther.**, Zhengzhou, v. 1, n. 22, p. 1-8, 2010.
- LIN, C. S. et al. Is CD34 Truly a Negative Marker for Mesenchymal Stem Cells? **Cytotherapy**, Oxford, v. 14, n. 10, 2012
- LI, M., CASCINO, P., UMMARINO, S., Di RUSCIO, A. Application of Induced Pluripotent Stem Cell Technology to the Study of Hematological Diseases. **Cells**, Basel, v. 6, n. 7, p. 1-14, 2017.
- LICHTINGHAGEN, R. et al. The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. **J. Hepatol.**, Copenhagen, v. 59, p. 236–242, 2013.
- LJUNGMAN, P. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. **B Mar. Transpl.**, Basingstoke, v. 37, n. 5, p. 439-449, 2006.
- LOK, D. J. Prognostic value of galectin-3, a novel marker of fibrosis, in patients with chronic heart failure: data from the DEAL-HF study. **Clin. Res. Cardiol.**, Darmstadt, v. 99, p. 323–328, 2010.
- LU, Z. et al. Osteoblasts on rod shaped hydroxyapatite nanoparticles incorporated PCL film provide an optimal osteogenic niche for stem cell differentiation. **Tissue Eng. A.**, London, v.17, p.1651-1661, 2011.
- MA, Z. Y. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 attenuates acute small-for-size liver graft injury in rats. **Am. J. Transplant.**, Copenhagen, v. 10, p. 784-95, 2010.
- MACKINNON, A.C. et al. Regulation of transforming growth factor- β 1-driven lung fibrosis by galectin-3. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, New York, v. 185, p. 537–546, 2012.
- MAGALHÃES, A. et al. Cytokine Profile Associated with Human Chronic Schistosomiasis Mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 21-26, 2004
- MAHLA, R. S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. **Int. J. C. Biol.**, New York, v. 2016, p. 1-24, 2016.
- MEDERACKE, I. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its etiology. **Nat. Commun.**, London, v. 4, n. 2823, 2013.
- MEIJER, C. et al. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. **Liver**, Copenhagen, v. 20, p. 66–77, 2000.
- MEIERHENRY, J. A. et al. Placenta as a Source of Stem Cells for Regenerative Medicine. **Curr. Pathobiol. Rep.**, New York, v. 3, p. 9-16, 2015.

- MENDICINO, M. et al., MSC-Based Product Characterization for Clinical Trials: An FDA Perspective. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 14, 2014.
- METWALLY, K. et al., Metalloproteinase Inhibitor-1 Closely Correlates With the Severity of Liver Disease in Egyptian Patients. **J. Liver Disease Transplant.**, Menoufiya, v. 6, n. 4, p. 2-5, 2017.
- MEZEY, E. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Scien.**, New York, v. 290, p.1779-1782, 2000.
- MITCHELL, J. B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal- associated and stem cell-associated markers. **Stem cells**, : Durham, v. 24. N. 2, p. 376-385, 2006.
- MINICIS, S., BATALLER, R., BRENNER, D. A. NADPH oxidase in the liver: Defensive, offensive, or fibrogenic? **Gastroenterology**, Baltimore, v. 131, n. 1,p. 272–275, 2006.
- MOKDAD, A. A., LOPEZ, A. D., SHAHRAZ, S. et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Med.**, London, v. 12, n. 145, 2014.
- MONICA, G. et al. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. **J. Exp. Med.**, New York, v. 197, p. 687-701, 2003.
- MOREAU, R.; RAUTOU, P. G-CSF Therapy for Severe Alcoholic Hepatitis: Targeting Liver Regeneration or Neutrophil Function? **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 109, p. 1424–1426, 2014.
- MORMONE, E., GEORGE, J., NIETO, N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. **Chem. Biol. Inter.**, Amsterdam, v. 193, p. 225–231, 2011.
- MURPHY, F. R. et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: Implications for reversibility of liver fibrosis, **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, n. 13, p.11069-11076, 2002.
- MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases, **Hepatol. Int.**, New York, v. 3, n. 4, p. 526-536, 2009.
- NASIR, A. G. et al. Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. **J. Translat. Med.**, London, v. 11, n. 78, 2013.
- NGUYEN, H. T., JACOBS, K., SPITS, C. Human pluripotent stem cells in regenerative medicine: where do we stand? **Reprod.**, Cambridge, v. 156, p.143–153, 2018.
- NIE, Q. et al. orrelation between TIMP-1 expression and liver fibrosis in two rat liver fibrosis models. **World J. Gastroenterol.**, Beijing , v. 12, n.19,p. 3044-3049, 2006.

- NIETO, N. et al. Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, p. 9853–9864, 2002.
- NOMBELA-ARRIETA, C., RITZ, J., SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nat. Rev. Mol. C. Biol.**, London, v. 12, n. 2, p. 126–131, 2011.
- NOWAKOWSKI, A. et al. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. **Acta Neurobiol. Exp.**, London, v. 73, p. 1–18, 2013.
- OGISO, T. et al. Granulocyte colony-stimulating factor impairs liver regeneration in mice through the up-regulation of interleukin-1 β . **J. Hepatol.**, Yamaguchi, v. 47, p. 816–825, 2007.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy.**, Oxford, v. 14, p. 339–349, 2012.
- OLVEDA, D. U. The chronic enteropathogenic disease schistosomiasis. **Internat. J. Infect. Dis.**, Hamilton, v. 28, p. 193–203, 2014.
- ORCIANI, M., DI PRIMIO, R., Skin-derived mesenchymal stem cells: Isolation, culture, and characterization. **Meth. Mol. Biol.**, Clifton, v. 989, p. 275–283, 2013.
- OWEN, A., NEWSOME, P. N. Mesenchymal stromal cells therapy in liver disease; opportunities and lessons to be learnt? **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 309, p. 791-800, 2015.
- OZOUGWU, J. C. Physiology of the liver. **Int. J. Res. Pharm. Biosc.**, Aba, v. 4, n. 8, p.13-24, 2017.
- PAREKKADAN, B., POLL, V. D., SUGANUMA, K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**, Cambridge, v. 2, 2007.
- PARSONS, C. J. et al. Antifibrotic effects of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 antibody on established liver fibrosis in rats. **Hepatology**, Baltimore, v. 40, 2004.
- PASSWEG, J.R. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. **Bone Marrow Transplant.**, Basingstoke, v. 51, p. 786–792, 2016.
- PEISTER, A. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. **Blood**, New York, v. 103, p. 1662-1668, 2004.
- PELLICORO, A. et al. Reversibility of liver fibrosis. **Fib. Tis. Rep.**, Edinburgh, v. 5 n. 1, p 1- 4, 2012.
- PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat. rev. Immunol.**, London, v. 14, n. 3, p. 181-94, 2014

- PEREIRA, V. A. importância do uso das células tronco para a saúde pública The importance of the use of stem cells for public health. **Cienc. S. Colet.**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 7–14, 2008.
- PINZANI, M. Pathophysiology of Liver Fibrosis. **Karger**, Basel, v. 33, p. 492-497, 2015.
- PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, New York, v. 284, p143-147, 1999
- POLI, G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. **Mol. Aspects Med.**, Oxford, v. 21, p. 49–98, 2000.
- QADURA, M. et al. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. **S. Cells**, New York, v. 36, p.161–171, 2018.
- RAAF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Ann. Rev. C. Develop. Biol.**, London v. 19, n.1, p. 1-22, 2003.
- RAJARAM, R. et al. Mesenchymal stem cell therapy for advanced liver cirrhosis: A case report. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, Richmond, v. 1, p. 153–155, 2017.
- RAY, P. et al. Application of Adult Stem Cells in Medicine. **S. C. Inter.**, London, v. 2015, p. 1-2, 2015.
- RAHMATI, M. et al. Colony Stimulating Factors 1, 2, 3 and early pregnancy steps: from bench to bedside. **J. Reprod. Immunol.**, Denver, v. 109, p.1-6, 2015.
- RAMACHANDRAN, P. et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. **PNAS**, Washington, v. 109, p. 3186-95, 2012.
- RODERFELD, M. et al. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice. **FASEB J.**, Bethesda, v. 20, p. 444-454, 2006.
- ROEB, E. Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). **Matrix Biol.**, Stuttgart, v. 68, n. 69, p.463–473, 2018.
- ROOT, R. K., DALE, D. C. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 179, p. 342-352, 1999.
- RUSSELL, K. C., et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. **S. Cells**, New Orleans, v. 28, p. 788-798, 2010.
- RUTELLA, S. Granulocyte colony stimulating factor for the induction of T-cell tolerance. **Transplant.**, Baltimore, v. 84, p. 26-30, 2007.

- SAGE, E. K., THAKRAR, R. M., JANES, S. M. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. **Cytother.**, Oxford, v. 18, p. 1435–1445, 2016.
- SAHA, B. K. et al. Therapeutic implications of granulocyte colony stimulating factor in patients with acute on chronic liver failure: increased survival and conytainment of liver damage. **Hepatol. int.**, New York, v. 11, n. 06, p. 540-546, 2017.
- SAKAIDA, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. **Hepatol.**, Baltimore,, v. 40, p. 1304–1311, 2004.
- SALAMA, H. et al. Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease. **Stem Cell Res. Ther.**, London, v. 5, p.70, 2014.
- SAMY. A. H. et al. Plasma osteopontin as a biomarker test in predicting liver fibrosis in Genotype 4 Chronic Hepatitis C infected patients. **Int. J. Microbiol. Immunol. Res.**, Cairo, v. 3, n. 3, p. 036-044, 2015.
- SANTINE, V. et al. The carboxy-terminal region of the granulocyte colony-stimulating factor receptor transduces a phagocytic signal. **Blood**, New York, v. 101, p. 4615– 4622, 2003.
- SAMSONRAJ, R. M. et al. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine, **Stem Cell Transl. Med.**, Hoboken, v. 6, p. 2173–2185, 2017
- SCOTT, M. A. Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **S. C. Develop.**, Larchmont, v. 20, n. 10, p. 1793-1804.
- SCHUPPAN, D.; KIM, Y.O. Evolving therapies for liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.123, n. 5, p. 1887-1901, 2013.
- SCHMITZ, V. et al. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. **Gut.**, London, v. 50, p.130–135, 2002.
- SCHWARZ, S. C., SCHWARZ, J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. **Transl. Res.**, Leipzig, v. 156, p.155–160, 2010.
- SEN, B. et al. Intranuclear Actin Structure Modulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation. **Stem Cells**, New York, 2017.
- SHAH, S. Z. et al. Frequency of causes of chronic liver disease in children. **Pak. Armed. Forces Med. J.**, Rawalpindi, v. 67, n. 5, p. 762-67, 2017.
- SHAH, N. D., BATALLER, R. Cell-based therapy to reverse advanced alcoholic liver fibrosis. **Ann. Hepatol.**, México, v. 15, n.5, p. 806-808, 2016.
- SHARMA, R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, Arlington, v.54, p. 1418-1437, 2014.

- SHIN, T. et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 18, p. 244, 2017.
- SI-TAYEB, K. et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. **Hepatol.**, Baltimore, v. 51, p. 297-305, 2010.
- SIMMONS, P. J., TOROK-STORB, B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. **Blood**, New York, v. 78, p. 2848–53, 1991.
- SINGH, V. et al. Efficacy of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and N-Acetylcysteine Therapies in Patients With Severe Alcoholic Hepatitis. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, Philadelphia, v. 16, p. 650–656, 2018.
- SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. **Acta Med. Iran.**, Tehran, v. 55, n.1, p. 6-23, 2016.
- SOUZA, V. F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. C. méd. Boil.**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 251–256, 2003.
- SOUZA, B. S. F. et al. Current Status of Stem Cell Therapy for Liver Diseases. **C. Transp.**, Elmsford, v. 18, p. 1261–1279, 2009.
- SPAHR, L. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Induces Proliferation of Hepatic Progenitors in Alcoholic Steatohepatitis: A Randomized Trial. **Hepatol.**, Baltimore, v. 48, p. 221-229, 2008.
- STOLZING, A. et al. Suspension cultures of bone marrow derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 21, n. 14, p. 2718-23, 2012.
- SIDNEY, L. E. et al. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. **Stem Cells**, New York, v. 32, p.1380–1389, 2014.
- SIMMERS, R. N. et al. Location of the G-CSF gene at chromosome 17 proximal to the breakpoint in the (15; 17) in acute promyelocytic leukemia. **Blood**, New York, v. 70, p. 330-332, 1987.
- TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nat. Rev. Mol. C. Biol.**, London, v. 5, p. 836–847, 2004.
- THEISE, N. D.; KRAUSE, D. S. Toward a new paradigm of cell plasticity. **Leuk.**, v. 16, p.542-548, 2002.
- THIELE, N. D. et al. TIMP-1 is upregulated, but not essential in hepatic fibrogenesis and carcinogenesis in mice. **Sci. Rep.**, London, v. 7, n. 714, 2016.
- TIDOW, N., WELTE, K. Advances in understanding postreceptor signaling in response to granulocyte colony-stimulating factor. **Curr. Opin. Hematol.**, Philadelphia, v. 4, n. 3, 171-175, 1997.

- TROEGER, J. S. et al. Deactivation of Hepatic Stellate Cells during Liver Fibrosis Resolution in Mice, **Gastroenterol.**, Baltimore, v. 143, n. 4, 2012.
- MAN, R. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling: Implications for G-CSF responses and leukemic progression in severe congenital neutropenia. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, Nijmegen, v. 27, p. 61–73, 2013.
- TRAUTWEIN, C. et al. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. **J. Hep.**, Aachen, v. 62, p.15–24, 2015.
- TROUNSON, A. et al. Clinical Trials for Stem Cell Therapies. **BMC Med.**, San Francisco, v. 9, n. 52, p.1741–7015, 2011.
- TSUCHIDA. T., FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepat.**, New York, v. 14, p. 397–411, 2017.
- TURINETTO, V., VITALE, E., GIACHINO, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 17, 2016.
- VARMA, M. J. et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v.16, n.1, p.91-104, 2007.
- VERFAILLIE, C. M. et al. Unexpected potential of adult stem cells. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, Washington, v. 996, p. 231-234, 2003.
- VIJAYALAKSHMY, K. et al. Potential Applications of Stem Cells in Livestock Production. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, Kurumbapet, Puducherry, v. 7, n. 3, p. 67-77, 2018
- VIZOSO, F. J. et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 18, n. 9, p.1852, 2017.
- VOLAREVIC, V. et al. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. **Autoimmunity**, Chur, v. 43, p. 255-263, 2010.
- VOLAREVIC, V. et al. Human stem cell research and regenerative medicine present and future. **Br. Med. Bull.**, London, v. 99, p. 155–168, 2011.
- WAGNER, J. et al. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Curr. Opin. in biotech.**, London, v. 20, n. 5, p531-536, 2009.
- WANG, J., et al. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. **Hepatol Res**, Shanghai, v. 39, p.1219-28, 2009.
- WANG, M., YUAN, Q., XIE, L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. **S. C. Internat.**, London, v. 2018, p. 2-14. 2018.
- WANG, M. et al. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and

Clinical Application. **S. C. Internat.**, Chengdu, v. 2018, p. 1-12, 2018.

WANG, Y. et al. Murine osteoblasts regulate mesenchymal stem cells via WNT and cadherin pathways: mechanism depends on cell-cell contact mode. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, Chichester, v. 1, n. 1, 39-50, 2007.

WANG, J. et al. Interleukin-10 secreted by mesenchymal stem cells attenuates acute liver failure through inhibiting pyroptosis. **Hepatol Res**, Nanjing, v. 48, p.194-202, 2018.

WATT, F. M., DRISKELL, R. R. The therapeutic potential of stem cells. **Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.**, London, v. 365, p. 155–163, 2010.

WEISKIRCHEN, R. et al. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. **Mol. Aspects. Med.**, Oxford, p. 2-14, 2018.

WEISKIRCHEN, R. et al. Recent advances in understanding liver fibrosis: bridging basic science and individualized treatment concepts. **F1000Research**, Aachen, v. 7, n. 921, p. 1-17, 2018.

WEN, Y. et al. Role of Osteopontin in Liver Diseases. **Int. J. Biol. Sci.**, Lake Haven, v. 12, n. 9, p.1121-1128, 2016.

WILLIAMS, R. Global challenges in liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 44, p. 521–526, 2006.

WÜRFEL, W. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor in patients with repetitive implantation failures and/or recurrent spontaneous abortions. **J. Reprod. Immunol.**, Amsterdam, v. 108, p. 123-135, 2015.

WYSE, R. D.; DUNBAR, G. L.; ROSSIGNOL, J. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegenerative diseases. **Internat. J. Mol. Scienc.**, Basel, v. 15, n. 2, p. 1719–1745, 2014.

XAGORARI, A. et al. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned médium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, Madison, v. 6, p. 831-840, 2013.

XIAO, B., LU, C., LINK, H. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. **J. C. Mol. Med.**, Bucharest, v. 11, n. 6, p. 1272-1290, 2007.

XUE, P., WANG, M., YAN, G. Mesenchymal stem cell transplantation as an effective treatment strategy for ischemic stroke in Asia: a meta-analysis of controlled trials. **Ther. Clin. Risk. Manag.**, Albany, v. 14, p. 909-928, 2018.

YANG, Q. et al. Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Patients with Liver Failure: a Meta-Analysis. **J. Clin. Translat. Hepatol.**, Hong Kong, v. 4, p. 90-96, 2016.

YANG, Q. et al. Effects of Granulocyte Colony-stimulating factor on patients with liver failure: a meta-analysis. **J. C .transl. hepatol.**, Hong Kong, v. 4, n. 2, p. 90-96, 2016.

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.**, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 108–119, 2005.

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.**, Copenhagen, v. 34, n.11, p. 1583-1587, 2006.

YAPING, Z. et al. Mechanism of interleukin-1beta-induced proliferation in rat hepatic stellate cells from different levels of sig- nal transduction. **APMIS**, New York v. 122, p. 392-398, 2014.

YEH, S. P. et al. Induction of CD45 expression on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Leukemia**, Baltimore, v. 20, p. 894–896, 2006.

YU, L. et al. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. **Circ. Heart Fail.**, Hagerstown, v. 6, p.107–117, 2013.

ZHANG, Y., YAO, X. Role of c-Jun N-terminal kinase and p38 activation protein-1 in interleukin-1beta-mediated type I collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. **Apmis**, Toronto, v. 120, p.101-7, 2012.

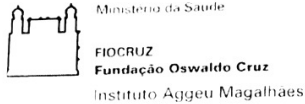
ZHAO, D. C. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 11, n. 22, p. 3431-40, 2005.

ZHAO, L. et al. Enhanced cell survival and paracrine effects of mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor promote cardioprotection in myocardial infarction. **Exper. C. Res.**, Hong Kong, v. 344, n. 1, p.30-39, 2016.

ZHOU, Y. et al. An abnormal bone marrow microenvironment contributes to hematopoietic dysfunction in Fanconi anemia. **Haematologica**, Pavia, v. 102, n. 6, p. 1017-1027, 2017.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A SUPEREXPRESSION DE FATORES ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA**” protocolado sob nº **108/2016** pelo (a) pesquisador (a) Dra **Sheila Andrade de Oliveira** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 11/05/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 11 de maio de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (C57BL6)	382 (20-23 gr/ 30 dias/ machos e fêmeas)
TOTAL	382

We certify that project “**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A SUPEREXPRESSION DE FATORES ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA**” (CEUA Protocol nº 108/2016) coordinated by **SHEILA ANDRADE DE OLIVEIRA** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on may, 11, 2017. In present version this project is licensed and valid until may 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) May, 11, 2017

Dr Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Matr. SIAPE: 1971435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / Fiocruz