

Potencialidades da terapia com células-tronco na regeneração hepática

Potentialities of stem cell therapy in hepatic regeneration

RIALA6/1081

Ana Caroline BRAUN¹ e Patricia PRANKE^{1,2*}

*Endereço para correspondência: Laboratório de Hematologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS
Av. Ipiranga n.2752 Porto Alegre, RS, Brasil, CEP: 90160-000, Tel. +55 51 3308-5275/5257 Fax.+55 51 3308-5437. E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

¹ Faculdade de Farmácia, PUC-RS, Porto Alegre, Brasil.

² Faculdade de Farmácia e Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Recebido: 01/02/2005 – Aceito para publicação: 06/04/2006

RESUMO

As células-tronco são capazes de dar origem a diferentes tecidos e órgãos. Muitos artigos e experimentos científicos têm sido realizados com o intuito de conhecer melhor os mecanismos pelos quais essas células agem para regenerar os tecidos danificados e na atividade terapêutica de doenças incuráveis. O fígado possui uma notável capacidade de auto-reparo. As células hepáticas envolvidas na regeneração do fígado expressam os muitos dos marcadores presentes nas células-tronco hematopoéticas. Além disso, já foi demonstrado que as células da medula óssea podem originar células do epitélio hepático. Neste contexto, pode-se sugerir que as células-tronco desempenham um papel de suma importância no reparo das células hepáticas lesadas.

Palavras-chave. células-tronco, hepatócitos, fígado.

ABSTRACT

Stem cells are capable to originate several and diverse tissues and organs. A considerable number of papers and trials have been performed improve the understanding on the mechanisms by which these cells operate to regenerate damaged tissues and to treat incurable diseases. The liver has a remarkable ability for self-restoration. Hepatic cells involved in liver regeneration express many of the markers as hematopoietic stem cells. Moreover, it has been shown that bone marrow cells can originate cells from hepatic epithelium. Therefore, it is conceivable to suggest that stem cells have an important role in restoring liver injuries.

Key words. stem cells, hepatocytes, liver.

SUMÁRIO

Introdução	147
Células-tronco: fatos e promessas	148
O fígado e sua regeneração	149
Células-tronco e o fígado	150
Hepatócitos	150
Células ovais hepáticas	150
Células da medula óssea	151
Células multipotentes progenitoras adultas e células-tronco mesenquimais	152
O sangue de cordão umbilical como fonte de células para doenças hepáticas	152
Mecanismos de regeneração hepáticas através das células-tronco	152
Fusão ou diferenciação?	153
Estudo com células-tronco em doenças hepáticas no Brasil	153

Conclusões	154
Referências	154

INTRODUÇÃO

O estudo das células-tronco é uma das áreas mais fascinantes da biologia, atualmente¹. Essas células potentes são o foco das últimas pesquisas na esperança de cura de doenças degenerativas e uma das chaves do misterioso desenvolvimento humano². Os estudos nesta área estão constantemente trazendo novas descobertas sobre as fantásticas habilidades dessas células quando transplantadas em camundongos ou ratos, na capacidade dessas células de regenerar órgãos, formar vasos sanguíneos, ossos e repararem danos espinhais e cerebrais³.

Até pouco tempo atrás, pensava-se que a formação e a regeneração de órgãos nos adultos só ocorressem através da ação células-tronco órgãos específicas. Desse modo, células-tronco hematopoéticas, por exemplo, produziram apenas células sanguíneas e células-tronco neurais produziram apenas células do sistema nervoso central. Entretanto existem trabalhos recentes que amplificam esta idéia e, atualmente, têm sido mostrado que as células-tronco de um sistema, por exemplo o sistema hematopoético, podem se desenvolver em células diferenciadas dentro de outro sistema, tal como o fígado, cérebro ou rim. Essa plasticidade, a capacidade da célula-tronco de originar diferentes tipos celulares¹, não é observada apenas em ensaios laboratoriais, mas também tem sido mostrada em humanos após transplantes de órgãos e medula óssea⁴.

As células-tronco têm algumas características importantes que as distinguem dos outros tipos de células: a primeira refere-se ao fato de que são células não-especializadas, ou diferenciadas, que se renovam por longos períodos através de divisão celular; a segunda é que, sob certas circunstâncias fisiológicas e experimentais, elas podem ser induzidas à diferenciação em células com funções especiais, como células produtoras de insulina do pâncreas¹. Em outras palavras, a célula-tronco possui a capacidade de ser clonogênica⁵.

Os cientistas trabalham com dois tipos de células-tronco de animais e de humanos: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias humanas foram isoladas pela primeira vez em 1994⁶.

As células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Totipotentes são as células com capacidade de originar todos os tipos células do organismo, inclusive os anexos embrionários⁷. Essas células correspondem às células do embrião ou blastocisto até o terceiro dia após a fecundação.

As células-tronco chamadas pluripotentes, são células capazes de formar todos os tipos celulares do organismo das três camadas germinativas, ectoderma, mesoderma e endoderma⁷, mas não as células dos anexos embrionários. Essas

células são aquelas presentes na parte interna do blastocisto, o qual corresponde às células entre o quarto e quinto dias após a fecundação, mas antes ainda da implantação no útero, que ocorre a partir do sexto dia^{8,9}. O blastocisto, cujo estágio precede a fase denominada gástrula, é formado por aproximadamente 150 células-tronco embrionárias, as quais são células indiferenciadas⁹ e especializadas. Devido ao fato do blastocisto, quando implantado no útero, ser capaz de formar o organismo humano, as células-tronco neste estágio têm a capacidade de originar os mais de 200 tipos celulares diferentes que compreende o corpo humano. Entre esses, neurônios, células musculares (miócitos), células epiteliais, células sanguíneas, células ósseas (osteócitos), cartilagem (condrócitos), células pancreáticas e outras^{2,7}.

As células-tronco multipotentes, por sua vez, são as células com a capacidade de plasticidade mais limitada. Ou seja, células capazes de originar diferentes tipos celulares, porém, geralmente, mais limitado ao tipo de tecido nos quais residem.

A célula-tronco adulta é a célula encontrada junto a outras células diferenciadas em um tecido ou órgão e que pode se regenerar e se diferenciar em células especializadas desses tecidos. As células-tronco adultas, normalmente regeneram o tecido onde estão localizadas¹.

Por isso, até pouco tempo atrás, acreditava-se que as células-tronco adultas eram células-tronco multipotentes ou unipotentes, essas últimas, que originam apenas uma linhagem celular⁷. Entretanto, vários experimentos mostraram a maior plasticidade de alguns tipos de células-tronco adultas¹. Entre essas estão as chamadas células-tronco mesenquimais e as MAPCs (*Multipotent Adult Progenitor Cells* - Células Multipotentes Progenitoras Adultas). Essas células podem ser encontradas na medula óssea, cordão umbilical entre outros tecidos.

As células-tronco embrionárias são as células encontradas no blastocisto, e são chamadas de células pluripotentes. As células-tronco adultas podem ser isoladas do fígado, pâncreas, rins, sistema nervoso, entre outros órgãos, cada uma com um potencial regenerativo variado². Através de transplantes, foi demonstrado que as células-tronco da medula óssea são capazes de regenerar o fígado e de se diferenciarem em hepatócitos maduros^{10,11}. Embora existam células-tronco adultas em inúmeros órgãos e tecidos, as células-tronco adultas mais comumente utilizadas na pesquisa e na terapia celular são as células da medula óssea, do sangue periférico e do sangue de cordão umbilical, devido a maior facilidade na obtenção desse material biológico.

Em relação ao fígado, a regeneração deste órgão, depois de perder tecido hepático, é um parâmetro fundamental da

resposta do fígado a uma lesão. Os gregos ancestrais já se referiam à capacidade de regeneração do fígado com o mito de Prometheus. Segundo a mitologia grega, Prometheus pertencia à raça de Titans que habitava a Terra antes da criação da raça humana. Por ter roubado o fogo secreto de Zeus, o Deus do Olimpos, como punição foi preso a uma rocha no Monte Caucasus e condenado a ter uma porção do seu fígado comida diariamente por um abutre. Seu fígado se regenerava durante a noite, deste modo abastecendo o abutre com comida eterna e Prometheus com tortura eterna¹²⁻¹⁴.

As pesquisas com células-tronco no fígado introduziram uma nova era de controvérsias, otimismo e grandes expectativas¹⁵. Assim, esse trabalho teve como objetivo elucidar as recentes descobertas sobre células-tronco na terapêutica de doenças hepáticas.

Células-tronco: fatos e promessas

Muito do interesse em torno das células-tronco se deve à habilidade do desenvolvimento celular, presente em embriões, tecido fetal e vários tecidos adultos e à capacidade dessas células trocarem o seu curso normal e se diferenciarem em tipos células diversos, como células musculares, células da medula óssea, hepáticas, entre outras.

Uma célula-tronco embrionária humana desenvolvida em laboratório pode produzir um suprimento essencial ilimitado de células terapêuticas. Esse fenômeno já era conhecido em células-tronco embrionárias de ratos, mas não tinha sido demonstrado em humanos até a década passada³.

Entre os mecanismos que têm sido sugeridos como mecanismos de ação biológica das células-tronco estão a transdiferenciação e a fusão celular. Quando ocorre um dano grave em um órgão, a transdiferenciação ocorre mais prontamente. Dessa forma, as células-tronco atuam como um sistema de recuperação quando a própria capacidade regenerativa de um órgão está suprimida. A transdiferenciação é a aquisição de um novo fenótipo⁴. Ou seja, células de um determinado órgão originando células de um outro órgão. A fusão, por sua vez, consiste na união de duas células diferentes, mantendo as características fisiológicas e funcionais de uma delas.

As células-tronco são identificadas como células indiferenciadas capazes de proliferação, manutenção própria, produção de um grande número de progenitores funcionais diferentes e de capacidade de regeneração do tecido depois de lesão¹⁶. As células que preenchem todos esses critérios são, atualmente, chamadas de as verdadeiras células-tronco. O melhor exemplo de célula-tronco é a célula-tronco embrionária¹⁵.

As células-tronco mais flexíveis vêm do interior da massa celular do blastocisto. Essas células são essencialmente pluripotentes, ou seja, são capazes de originar todas as células as três camadas germinativas⁴. O potencial terapêutico de diferenciação celular pode controlar os sintomas das doenças degenerativas neurológicas em modelos animais².

Enquanto as células-tronco embrionárias estão crescendo em cultura, sob certas condições, elas podem permanecer indiferenciadas. Mas se permitirem que as células se agrupem para formar um corpo embrionário, estas podem começar a se diferenciarem espontaneamente. Elas podem formar células musculares, células nervosas e vários outros tipos de células. Embora a diferenciação espontânea seja um bom indicador de que a cultura de células-tronco embrionárias é saudável, não é um método eficiente de produção de cultura de tipos celulares específicos. Então, para gerar cultura de tipos celulares específicos, cientistas precisam controlar a diferenciação de células-tronco embrionárias. Com isso, as células-tronco poderão ser usadas para tratar várias doenças no futuro¹.

Nos transplantes alogênicos (onde o doador e receptor são indivíduos geneticamente diferentes) usando-se células-tronco embrionárias cultivadas e diferenciadas continuam com o problema da incompatibilidade imunológica entre o doador das células-tronco e o receptor. Drogas imunossupressoras podem ser previamente administradas ao transplante, mas seus efeitos colaterais não são facilmente minimizados. A manipulação genética do doador de células antes do transplante é uma alternativa, mas pesquisas neste assunto ainda são vagas².

Uma vez que, para se obter células-tronco embrionárias necessita-se de embrião humano, os estudos com as células-tronco embrionárias têm encontrado vários obstáculos em relação às questões éticas. Nos diferentes países ao redor do mundo os quais permitem o uso destas células, os critérios normalmente são: 1) as células-tronco devem ser provenientes de um embrião criado para propósitos reprodutivos, 2) o embrião criado não precisou ser usado para esse propósito estando, portanto, excedente, 3) um consentimento informado da doação do embrião deve ser obtido. Nenhuma ajuda financeira pode ser dada para doação de embriões. E, obviamente, a clonagem humana tem sido condenada e deve ser banida da humanidade.

Por outro lado, sem envolver grandes discussões éticas, paralelamente as células-tronco adultas hematopoéticas já são usadas na clínica com sucesso há mais de 30 anos, através do antigo procedimento chamado transplante de medula óssea. Atualmente, esse procedimento é denominado transplante de células-tronco², uma vez que, além da medula óssea, o sangue periférico e o sangue de cordão umbilical também são usados como fontes de células-tronco adultas.

Uma célula-tronco adulta é uma célula não diferenciada, encontrada entre células de um tecido ou órgão especializados. O primeiro papel das células-tronco adultas em um organismo vivo é manter e reparar o tecido no qual estão. As pesquisas com células-tronco adultas começaram há 40 anos atrás. Nos anos 60, cientistas descobriram que a medula óssea continha dois tipos de células-tronco. Uma população chamada célula-tronco hematopoética, que forma todo tipo de células sanguíneas. A segunda população, chamada células do estroma da medula óssea, foi descoberta alguns anos depois. As células

estromais são uma população de células que podem gerar ossos, cartilagem, gorduras e tecido fibroso. Atualmente, as células estromais são identificadas como sendo as chamadas células-tronco mesenquimais¹.

Vários tecidos contêm células-tronco adultas como sistema nervoso central, medula óssea, sangue periférico, vasos sangüíneas, músculo esquelético, pele, fígado, entre outros. Cientistas de vários laboratórios estão tentando encontrar maneiras de fazer crescer células-tronco adultas em cultura e manipulá-las para gerar tipos específicos de células, para que elas possam ser usadas para tratamento de doenças e lesões. Um exemplo de tratamento inclui o restabelecimento da produção de dopamina no cérebro de pacientes com Parkinson¹.

O uso terapêutico das células-tronco adultas e embrionárias apresentam vantagens e desvantagens. Essas células diferem no número e no tipo de células em que podem se diferenciar. Embora cada vez mais têm sido identificados tipos de células-tronco adultas com plasticidade semelhante às embrionárias, as células-tronco embrionárias podem crescer em cultura facilmente, enquanto que células-tronco adultas são raras em tecidos maduros e seus métodos de cultura ainda não funcionaram bem. Essa é uma distinção muito importante, pois é necessário um grande número de células para a terapia com células-tronco. Uma grande vantagem no uso de células-tronco adultas é que as próprias células do paciente podem ser expandidas em cultura e re-introduzidas no paciente, o que significa que não serão rejeitadas pelo sistema imune. Porém, esse uso autólogo, ou seja, uso das células do próprio paciente, não pode ser realizado para doenças genéticas. As células-tronco embrionárias de um doador introduzidas em um paciente podem causar rejeição. Por outro lado, se forem utilizadas tanto células-tronco adultas como embrionárias de um doador imunologicamente compatível, o problema de rejeição estaria resolvido. Em alguns casos, as células-tronco podem atravessar as camadas germinativas e contribuir para a regeneração de tecidos de outra camada germinativa. Por exemplo, as células-tronco da medula óssea, que se originam da camada mesodérmica, podem contribuir para a regeneração do fígado que se origina da camada endodérmica. O cruzamento de camadas germinativas mostra outra dimensão da plasticidade das células-tronco adultas¹.

Uma vez que as células-tronco multipotentes persistem até a idade adulta e são responsáveis pela propriedade de regeneração de diversos órgãos², vários autores acreditam que as células-tronco provenientes da medula óssea podem fazer crescer hepatócitos e células do ducto biliar. A importância deste fato está em que as células hepáticas geradas pelo próprio paciente não provocam rejeição pelo sistema imune e, portanto, não há necessidade de administrar drogas imunossupressoras ao paciente¹². Esse fato, se cientificamente comprovado, irá revolucionar o estudo das células-tronco e da terapia celular para as lesões hepáticas.

O fígado e sua regeneração

Ao final da primeira semana, o blastocisto, se presente no organismo materno, será implantado superficialmente no endométrio uterino. As três camadas germinativas começam a aparecer na terceira semana de gestação, durante a gastrulação. O ectoderma dá origem à epiderme, ao sistema nervoso central e periférico, à retina do olho e a várias outras estruturas. O endoderma é a fonte dos revestimentos epiteliais das vias respiratórias, do trato gastrointestinal, incluindo as glândulas que nele desembocam, assim como as células glandulares dos órgãos associados, tais como fígado e o pâncreas. O mesoderma dá origem às capas do músculo liso, tecido conjuntivo e vasos associados aos tecidos e órgãos. O mesoderma também forma a maior parte do sistema cardiovascular e é a fonte das células do sangue e da medula óssea, do esqueleto, músculos estriados e órgãos reprodutores e de excreção⁹.

O fígado, a vesícula biliar e o sistema de ductos biliares surgem de uma invaginação central da parte caudal do intestino anterior no início da quarta semana. O fígado cresce rapidamente e, da quinta a décima semana, preenche grande parte da cavidade abdominal. A quantidade de sangue oxigenado que flui da veia umbilical para o fígado determina o desenvolvimento e a segmentação funcional do fígado. Inicialmente, os lobos direito e esquerdo são aproximadamente do mesmo tamanho, mas o lobo direito logo se torna maior. A hematopoese, no fígado, começa durante a sexta semana, conferindo ao fígado seu aspecto vermelho brilhante. Essa atividade hematopoética é a principal responsável pelo tamanho relativamente grande do fígado entre a sétima e a nona semanas do desenvolvimento e na nona semana, o fígado perfaz cerca de 10% do peso total do feto⁹.

O fígado é bem conhecido por sua capacidade de regeneração. O órgão inteiro pode regenerar-se novamente a partir de um pequeno pedaço, como um terço do tecido original. Essa resposta restaurativa é atribuída à grande habilidade dos hepatócitos em se dividirem, que é mais de 12 a 16 divisões por célula. Além disso, estudos recentes em modelos animais demonstraram a existência de células-tronco hepáticas endógenas e exógenas capazes de formar hepatócitos e ductos biliares².

Já há muitas décadas, foi mostrada a capacidade regenerativa do fígado. O modelo experimental de Higgins e Anderson¹⁷ para o estudo da regeneração desse órgão consistia em, através de um procedimento cirúrgico, remover dois terços do fígado de rato. Lobos específicos do fígado eram removidos intactos, sem danos aos lobos que ficaram. Os lobos residuais ampliaram-se refazendo a massa dos lobos removidos, ainda que os lobos retirados nunca mais cresceram. A resposta regenerativa do fígado é proporcional à quantidade de células que foram removidas.

Ao contrário da regeneração de outros tecidos como a medula óssea ou a pele, a regeneração do fígado não depende de um pequeno grupo de progenitores ou de células-tronco. Entretanto, células com propriedades de células-tronco podem aparecer em grande número quando a proliferação de hepatócitos maduros é inibida¹³.

Os animais, inclusive a espécie humana, podem sobreviver a uma remoção cirúrgica de mais de 75% da massa hepática. Dependendo do organismo, o número original de células é restabelecido dentro de uma semana e a massa original dentro de 2 a 3 semanas. Esse processo pode ocorrer repetitivamente, indicando uma capacidade regenerativa muito alta ao contrário dos outros órgãos parenquimais como rins e pâncreas¹⁸.

Células-tronco e o fígado

Uma das primeiras demonstrações de plasticidade de células-tronco foi observada no fígado¹². Em uma simples perda de hepatócitos, como a causada por uma hepatectomia parcial sem complicações de infecção viral ou inflamação, ocorre uma resposta regenerativa rápida para restaurar a massa do fígado¹⁹.

O Transplante de Medula Óssea tem sido usado por décadas, com sucesso, experimentalmente e na medicina clínica para reconstituir o sistema hematopoético, incluindo o sistema imune do receptor com células derivadas do doador. Recentemente, foi sugerido que as células-tronco hematopoéticas humanas, particularmente as do sangue de cordão umbilical, também podem fazer crescer células hepáticas em xenotransplantes¹⁸.

De acordo com Mitaka²⁰, a questão da existência de células-tronco no fígado de animais adultos tem sido debatida por cerca de meio século. Embora muitos pesquisadores em todo mundo tentaram identificar e caracterizar essas células no fígado, resultados convincentes ainda não foram notificados. A partir de estudos sobre o desenvolvimento hepático, parece que a maioria dos hepatócitos e células do ducto biliar do fígado adulto derivem originalmente de hepatoblastos residentes no fígado fetal. Dessa maneira, hepatoblastos são considerados as células-tronco progenitoras de células epiteliais hepáticas. Entretanto, não é possível encontrar células morfológica e fenotipicamente similares aos hepatoblastos no fígado adulto normal, até mesmo no fígado em regeneração. Assim, persiste a dúvida se há ou não células-tronco no fígado dos animais adultos²⁰. Por outro lado, embora células-tronco hepáticas adultas não tenham sido isoladas ainda, tem sido demonstrada uma enorme capacidade de repopulação de hepatócitos maduros transplantados sob condições de dano contínuo hepático¹⁵.

Theise et al.²¹ mostraram que uma única célula-tronco hematopoética não só reconstitui o sistema hematopoético de rato mas também contribui para multiplicar outros tecidos, inclusive o epitélio do fígado. Foi observado, também, que existem hepatócitos derivados da medula óssea, mas os resultados ainda são considerados controversos quanto a sua importância funcional no dano hepático. Em um modelo animal, o restabelecimento das células do fígado derivadas da medula óssea mostrou resposta ao dano hepático, particularmente na regeneração dependente de progenitor.

Os hepatócitos podem ser originados por diferenciação direta das células-tronco hematopoéticas ou por via indireta, com uma célula hepática oval intermediária. Células ovais são as células que surgem da resposta ao dano hepático e são derivadas do ducto biliar. Essas células ovais são células-tronco hepáticas que existem no canal de Hering. O modelo oposto a esse, sugere que os precursores de células ovais hepáticas residem somente no fígado e que a medula óssea contribui muito pouco com as células epiteliais hepáticas, mesmo durante o dano¹⁸.

Vários modelos de transplantes celulares têm mostrado que hepatócitos podem passar por uma expansão clonal significativa. Algumas observações indicam que hepatócitos são uma população de células-tronco funcionais do fígado. Um dano hepático mais grave ativa o compartimento de uma segunda população de células-tronco facultativas (as células ovais) localizado na árvore biliar intra-hepática, dando crescimento ao epitélio biliar inclusive os lóbulos antes que estas células se diferenciem em hepatócitos. Uma terceira população de células-tronco com potencial hepático reside na medula óssea. Essas seriam as células-tronco hematopoéticas que, segundo alguns estudos, fazem a contribuição mais significativa para a regeneração hepática¹⁹, contradizendo outros achados¹⁸. Como essas três populações de células-tronco se integram para manter a homeostasia ainda não foi claramente entendido¹⁹.

Hepatócitos

Thiese et al.²¹ e Alisson et al.²² também demonstraram que os hepatócitos podem ser gerados de uma população celular da medula óssea em humanos⁴. O transplante de hepatócitos tem sido sugerido como uma alternativa para pacientes esperando um transplante de fígado². Até pouco tempo atrás, acreditava-se que hepatócitos só podiam ser derivados de células de origem endodérmicas e seus progenitores. Entretanto estudos recentes sugerem que células não endodérmicas também podem formar hepatócitos *in vivo* e *in vitro*²³.

O transplante de hepatócitos pode ser realizado nos casos em que há doador de fígado para o transplante do órgão inteiro, tem demonstrado que células hepáticas transplantadas são capazes de expansão clonal significativa. Apesar de não se conhecer um tráfego de células entre o pâncreas e o fígado, está claro que as células pancreáticas podem se diferenciar em hepatócito, que é o seu tipo celular embrionicamente relacionada¹⁹.

Células ovais hepáticas

As células ovais hepáticas, células pequenas com citoplasma escasso e núcleo ovóide²⁰, são uma população celular que deve constituir o compartimento de células-tronco no fígado^{2,23}. Essas células-tronco hepáticas existem em pequenas unidades da árvore biliar, nos canais de Hering², de onde essas células migram para o parênquima hepático²³.

Pelo fato das células ovais só se proliferarem quando a replicação dos hepatócitos é prejudicada, elas são consideradas progenitoras das células-tronco hepáticas similares que podem se diferenciar em linhagens hepática, biliar, intestinal e pancreática em vários modelos de roedores²⁴. Vários estudos têm demonstrado a capacidade das células ovais em se diferenciar em hepatócitos¹. Exames detalhados revelaram que, primeiramente, as células ovais se transformam em pequenos hepatócitos basofílicos para, então, se transformarem em hepatócitos maduros²⁰.

As células ovais hepáticas expressam diversos marcadores hematopoéticos, como Thy 1.1, CD34, receptor de Flt3 e c-Kit^{4,18,23,25,26}. Esses achados corroboram com os diversos estudos que têm mostrado que as células da medula óssea podem originar diversos tipos de células epiteliais hepáticas, incluindo células ovais, hepatócitos e epitélio do ducto¹⁸. No entanto, a origem dessas células-tronco não é completamente conhecida⁴. Porém, quando um grande dano ocorre sobre o fígado ou a sua regeneração depois de uma lesão está comprometida, ocorre a ativação das células ovais e o número dessas células aumenta proporcionalmente à gravidade da doença do fígado humano¹⁹.

Mesmo que a localização anatômica da proliferação das células ovais sugere a existência de um progenitor de hepatócitos no canal de Hering, as propriedades precisas e a origem das células ovais permanecem incertas. Porém, estudos recentes em ratos e humanos sugerem que as células ovais sejam derivadas da medula óssea¹⁸.

Células da medula óssea

Estudos recentes mostram que a pesquisa de células-tronco no fígado, é uma área de importante investigação científica. Um dos mais importantes achados, é que as células-tronco do fígado podem ser derivadas da medula óssea. Têm-se sugerido que as células da medula óssea seriam a terceira fonte de células durante o processo de regeneração hepática ao lado dos hepatócitos e das células-tronco endógenas do fígado²⁵.

A medula óssea apresenta vários tipos de células-tronco, como as células-tronco hematopoéticas, as células-tronco mesenquimais, as MAPCs, entre outras. As células-tronco da medula óssea podem escapar para a corrente circulatória podendo, portanto, serem encontradas também (embora em pequena quantidade) no sangue periférico do indivíduo. Essas células-tronco também podem ser encontradas no sangue do cordão umbilical do recém-nascido.

Shu et al.²⁶ e Petersen et al.²⁷ demonstraram que as células da medula óssea de ratos têm o potencial de se desenvolver em células ovais e em hepatócitos *in vivo*, mostrando a potente função das células da medula óssea na regeneração do fígado^{11,28}. Essas observações aumentam a possibilidade de que essas células possam ser usadas, além da terapia celular, para a terapia genética no fígado.

Alison et al.²² mostraram que algumas células da medula óssea humana se tornaram células hepáticas em pacientes que receberam transplante de medula óssea. Nesse estudo, mulheres que receberam transplante de medula óssea de doadores masculinos apresentaram células hepáticas que continham o cromossomo Y, provavelmente derivadas do transplante de medula óssea ocorrido anteriormente. Se por um lado, esse fato sugere o possível uso das células de medula óssea no tratamento de doenças hepáticas³, por outro lado, outros estudos sugerem que hepatócitos derivados da medula óssea existem, mas são extremamente raros, pois esses hepatócitos seriam gerados por fusão celular e não por diferenciação de células-tronco. Entretanto as células derivadas da medula óssea podem ter um importante papel indireto na regeneração do fígado.

Apesar das observações de que as células hepáticas epiteliais possam ser derivadas da medula óssea, duas questões importantes permanecem. Primeiro, não está claro qual o tipo de célula na medula óssea é o precursor de células hepáticas. Segundo, a capacidade funcional dessas células ainda não está comprovada¹⁸.

O atual interesse no papel das células-tronco da medula óssea na regeneração do fígado começou com o descobrimento de que as células ovais de rato induzidas por um clássico regime carcinogênico expressavam genes tipicamente associados a células-tronco hematopoéticas. No entanto, a expressão de marcadores de células-tronco hematopoéticas não ocorre unicamente em ratos. Células ovais humanas, isoladas de pacientes com doenças biliares crônicas, expressam CD34 como também marcadores do ducto biliar (CK19). A molécula CD34 é o marcador de superfície clássico de células-tronco hematopoéticas. Trabalhos recentes têm mostrado que somente células que apresentam os marcadores c-Kit, Lin-, Sca-1+ e Thy-1 promovem o crescimento de hepatócitos. Esse achado sugere, embora não comprove, que as células-tronco hematopoéticas possam ser precursoras de hepatócitos¹⁸.

Corroborando essa hipótese, está o fato de que a hematopoese e o ambiente hepático são conhecidos por ter um íntimo relacionamento no momento do desenvolvimento hepático e em doenças sistêmicas. Na vida intra-uterina, o fígado fetal é o órgão responsável pela formação das células sanguíneas, durante alguns meses. Recentemente, o transplante de células isoladas da medula óssea de roedores e de humanos, tem se diferenciado em células ovais, as quais são consideradas as células-tronco hepáticas e em hepatócitos no fígado²⁰.

Petersen et al.²⁷ mostraram que no transplante de células da medula óssea, em rato letalmente irradiados, as células migravam para o fígado e então se diferenciavam em células ovais e hepatócitos. Lagasse et al.²⁹ mostraram que células-tronco hematopoéticas purificadas podem se diferenciar em hepatócitos e recompor partes do fígado em camundongo com tiroseemia hereditária com novos hepatócitos maduros originados da medula óssea²⁰. Estudos mais recentes mostraram que células-tronco do sangue periférico, mobilizadas por fatores de

crescimento hematopoéticos, também apresentaram um campo promissor na capacidade de regeneração hepática, através da formação de hepatócitos³⁰.

Apesar das células-tronco hematopoéticas serem considerada uma fonte de células para a diferenciação em hepatócitos, alguns estudos mostram que subgrupos de células não-hematopoéticas também exercem este papel. Essas células seriam, portanto, células CD45 negativas²⁵, uma vez que esta molécula de superfície celular é considerada um marcador leucocitário.

Assim, a medula óssea contém, além das células-tronco hematopoéticas, células-tronco mesenquimais²⁵ entre outras.

Células multipotentes progenitoras adultas e células-tronco mesenquimais

As células multipotentes progenitoras adultas (MAPCs) são uma população de células-tronco adultas que podem ser isoladas da medula óssea de várias espécies de mamíferos. Essas células têm propriedades similares às células-tronco embrionárias que podem se diferenciar em diferentes linhagens *in vitro* em condições apropriadas. Esses tipos celulares incluem a linhagem mesenquimal, como músculo, cartilagem e ossos, linhagem neuroectodérmica como as diferentes classes de neurônios e linhagem endodérmica como os hepatócitos^{18,23}. As células multipotentes progenitoras adultas também foram transplantadas *in vivo* e células derivadas dessas também foram encontradas no fígado e pareciam ser hepatócitos^{25,31}.

Alguns autores, no entanto, consideram que as MAPCs seriam um subtipo das células-tronco mesenquimais (CTM). As CTM são células originadas da camada do mesoderma da fase embrionária³¹. As CTM são células indiferenciadas, altamente capazes de fazer auto-renovação, proliferação e diferenciação celular³². As CTM exercem um importante papel na regulação da hematopoese, bem como no sucesso do transplante de células hematopoéticas, uma vez que são o principal componente na formação do microambiente medular³³. As CTM são candidatas promissoras para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas na terapia com células-tronco³⁴ por serem capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, miócitos, células nervosas, adipócitos³³ e, inclusive, hepatócitos^{25,31,35}.

Além da medula óssea, em vários outros órgãos já foram descritos a presença de CTM, entre eles, o tecido adiposo, o pâncreas, o fígado^{36,37} e, também, o sangue cordão umbilical³⁸⁻⁴⁰.

O sangue de cordão umbilical como fonte de células para doenças hepáticas

O sangue de cordão umbilical tem sido utilizado, nos últimos anos, como uma importante fonte de células-tronco para reconstituir a medula óssea nos transplantes. No entanto, mais recentemente, foi identificado que as CTM presentes no sangue do cordão umbilical podem se diferenciar em hepatócitos. Esse material tem sido visto como uma nova e importante fonte de

células na terapia e transplante de células contra doenças hepáticas incuráveis^{35,39}.

Em 2004, foi identificado um novo tipo de células-tronco no sangue de cordão umbilical, denominado células-tronco somáticas irrestritas (*unrestricted somatic stem cells*), chamadas de USSCs. Essa é uma população rara de células não-hematopoéticas (CD45-negativas) pluripotentes presentes no sangue de cordão umbilical e que apresenta grande capacidade de proliferação e diferenciação celular⁴¹. Para verificar a capacidade de diferenciação *in vivo* das USSCs humanas em células hepáticas, em estudo experimental com modelo animal, as células transplantadas conseguiram, com grande eficiência, diferenciar-se em hepatócitos no fígado do receptor.

Embora o número de estudos sobre a utilização terapêutica de células-tronco a partir do sangue de cordão umbilical em doenças hepáticas seja ainda muito restrito, uma das razões de se acreditar que esta será uma importante fonte de células no futuro no tratamento das doenças hepáticas, é devido às vantagens que este material oferece em relação à medula óssea. Entre essas vantagens estão o menor risco de transmissão de vírus, a menor rejeição de células quando doadas por outro indivíduo mesmo se não totalmente compatível com o receptor, a facilidade da obtenção do material, devido ser um processo não invasivo, além da oferta praticamente ilimitada de células-tronco³⁸.

Mecanismos de regeneração hepáticas através das células-tronco

As células-tronco hepáticas podem ser classificadas de diferentes maneiras: 1) células responsáveis pelo "turnover" normal do tecido; 2) células responsáveis pela resposta à hepatectomia parcial; 3) células responsáveis pela regeneração dependente de progenitor; 4) células com capacidade de "repovoamento" no transplante de fígado e 5) células que resultam em fenótipos dos hepatócitos e do ducto biliar *in vitro*. Fortes evidências sugerem que diferentes tipos celulares e mecanismos são responsáveis pela reconstituição do órgão dependendo do tipo de dano hepático. Além disso, o restabelecimento do tecido por células endógenas (regeneração) deve ser distinguida da reconstituição por transplante de células ("repovoamento")¹⁸.

Assim, diversos trabalhos sobre a plasticidade de células-tronco e observações sobre a expressão de marcadores hematopoéticos em células ovais, levaram à hipótese de que as células-tronco da medula óssea podem, também, originar as células epiteliais, inclusive as células ovais hepáticas^{18,27}. A expressão de várias moléculas normalmente associadas com a medula óssea talvez explique porque a hematopoese é normalmente encontrada no fígado com células ovais ativas. No entanto, a maioria desses marcadores são perdidos quando as células ovais se diferenciam em hepatócitos.

Numerosos fatores de crescimento e citocinas, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento de

epiderme, TGF- α , TNF- α e IL-6, triiodotironina, insulina e agentes adrenérgicos podem ou facilitar ou iniciar a resposta regenerativa normal dos hepatócitos. Muitos desses mesmos fatores estão implicados no comportamento das células ovais⁴².

Os estudos de Theise et al²¹ sugerem que o transplante de células da medula óssea deve ser considerado como uma opção terapêutica no tratamento de doenças do fígado. No entanto, segundo os autores, as células epiteliais surgem por fusão e não por diferenciação, e as células ovais são geradas por células-tronco intra-hepáticas e não precursoras na medula óssea¹⁸. Esses achados mostram a grande controvérsia sobre a origem das células-tronco no fígado e a necessidade de ampliar os estudos.

Por outro lado, tem sido sugerido que as células-tronco hepáticas de qualquer linhagem, os hepatócitos, as células ovais ou as células-tronco hematopoéticas podem ter uso terapêutico no tratamento de várias doenças que afetam o fígado^{18,43}. Entre essas, estão diversas doenças genéticas que produzem doenças hepáticas, como a doença de Wilson e a síndrome de Crigler-Najjar, e em casos que possuem uma expressão extra-hepática da doença, como a deficiência do fator IX¹⁹.

Não está suficientemente claro como a diferenciação e/ou maturação de células-tronco hepáticas ocorrem na vida adulta. Como, por exemplo, as células-tronco hematopoéticas podem se diferenciar em células ovais ou células do ducto biliar e como as células ovais podem se tornar hepatócitos ou células do ducto biliar²⁰. No entanto, segundo estudo de Dabeva e colaboradores¹⁵, as células-tronco de um fígado fetal, quando isoladas, podem ser transplantadas com sucesso e repovoar mais de 10% do fígado normal.

Fusão ou diferenciação?

As condições apropriadas de cultura na qual as células da medula óssea se diferenciam em hepatócitos é de fundamental importância. Esse fato é determinante, não só para entender os mecanismos de diferenciação, mas também para uma eficiente amplificação das células progenitoras de hepatócitos originadas da medula óssea, como sendo um pré-requisito para o uso terapêutico⁴⁴.

Tanto a transdiferenciação como a fusão celular podem ser mecanismos de diferenciação de fenótipos de células em cultura e transplantadas. No entanto, seria necessário definir o mecanismo da formação de hepatócitos e de outras células diferenciadas das células-tronco hepáticas⁴⁵. A maioria dos experimentos que sugerem a transdiferenciação de células-tronco extra-hepáticas em hepatócitos também podem ser explicados por fusão entre as células doadas e os hepatócitos hospedeiros. Isto mostra que fusões entre células-tronco embrionárias e células diferenciadas, assim como entre progenitores da medula óssea e hepatócitos, podem ser um fenômeno comum¹⁵.

Há três mecanismos básicos que devem ser considerados quanto ao aparecimento de hepatócitos do doador após um transplante de células-tronco da medula óssea. Primeiro, a

medula óssea pode, teoricamente, abrigar células-tronco endodérmicas especializadas capazes de produzir hepatócitos e outras células epiteliais. Essa célula seria análoga às células-tronco mesenquimais que produzem derivados de mesoderma como músculo, cartilagem e gordura. Segundo, os hepatócitos e as células sangüíneas podem ser derivadas de uma mesma célula-tronco por diferenciação hierárquica. Terceiro, os hepatócitos derivados da medula óssea podem não ser totalmente derivados da diferenciação, mas preferencialmente da fusão celular. Essa possibilidade cresceu pela observação de que as células hematopoéticas podem espontaneamente se fundir com células-tronco embrionárias *in vitro* e produzir múltiplos tecidos em embrião de camundongo. Por fim, embora a fusão celular espontânea seja um evento muito raro mesmo na presença de um dano hepático muito grande, os hepatócitos derivados da medula óssea, mesmo se gerados por fusão celular, são totalmente funcionais e, conseqüentemente, poderão ter uso terapêutico¹⁸.

Estudo com células-tronco em doenças hepáticas no Brasil

A possibilidade da utilização de células-tronco na terapia e transplante em diferentes doenças hepáticas tem sido interesse da comunidade científica ao redor do mundo, inclusive no Brasil. No câncer hepático, na regeneração de uma lesão aguda do fígado, nas hepatites, na cirrose, entre outras doenças, bem como no estabelecimento de protocolos para a terapia gênica, as pesquisas com células-tronco mostram com um futuro promissor para sua utilização terapêutica^{46,47}.

Embora resultados de estudos clínicos com células-tronco em doenças hepáticas em seres humanos ainda sejam praticamente inexistentes na literatura científica, estudos preliminares mostram a capacidade terapêutica dessas células neste novo campo de investigação clínica. O Brasil vem se destacando internacionalmente em estudos clínicos com células-tronco em algumas áreas da saúde, como nas doenças cardíacas, em algumas doenças auto-imune e, mais recentemente, nas doenças hepáticas.

Um grupo de pesquisadores brasileiros realizou, em setembro de 2005, o primeiro transplante de células-tronco da medula óssea em paciente com cirrose crônica, em Salvador, Bahia⁴⁸. Com a iniciativa, o Brasil é o pioneiro no mundo em transplantes com células-tronco para tratamento de doenças hepáticas⁴⁹. O sucesso da utilização terapêutica de células-tronco é resultado de uma pesquisa iniciada há alguns anos pela unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) na Bahia. A utilização de células-tronco no tratamento reduziu em torno de 60% a fibrose hepática. A intenção dos pesquisadores foi tentar melhorar a qualidade de vida do paciente e aumentar a sobrevida até que o mesmo pudesse receber um novo fígado⁵⁰. Segundo os autores do estudo, o transplante das células-tronco não substitui a necessidade de transplante do fígado, mas poderá auxiliar centenas de pessoas que estão na fila à espera de um órgão para o transplante^{49,50}. Outros pacientes já estão sendo submetidos ao tratamento experimental com células-tronco⁴⁸.

O avanço na área de pesquisas clínicas marca uma nova era no estudo das doenças hepáticas e coloca o Brasil como uma importante referência no que diz respeito aos estudos com células-tronco para tratamento em seres humanos.

CONCLUSÕES

A falta de doadores de órgãos tem limitado muito o uso de transplantes na medicina. Desde os primeiros relatos, há dez anos atrás, que células-tronco embrionárias totipotentes podem ser extraídas de células pré-embriônicas humanas e se proliferam com sucesso, tanto o público em geral quanto a comunidade científica têm se interessado na esperança de potentes terapias baseadas em células-tronco para o tratamento de uma ampla variedade de doenças que afetam nossos órgãos vitais¹².

O fígado, amplamente estudado em relação às células-tronco, possui células que podem ser originadas da medula óssea, ou podem residir no próprio fígado e são ativadas quando necessárias. O transplante de hepatócitos, desenvolvido devido à falta de fígado doado para o transplante total, tem mostrado capacidade de expansão clonal significativa dentro do fígado lesado⁴.

Os próximos passos na pesquisa de células-tronco hepáticas são elucidar os mecanismos de diferenciação e maturação de cada célula e entender o papel dessas células na linhagem hepática.

Ao lado dos mecanismos de transdiferenciação ou fusão, há uma terceira hipótese que pode explicar o mecanismo de ação das células-tronco e que deverá ser amplamente investigada nos próximos anos. Talvez não seja nem a fusão e nem a transdiferenciação o principal mecanismo de regeneração tecidual das células-tronco. Até porque, alguns trabalhos vêm mostrando a presença de apenas um pequeno percentual de células do doador que permanece após a reconstituição funcional do tecido. Tal fato têm sido observado pela ausência de marcadores das células dos doadores, o que deveria permanecer na transdiferenciação.

Pode ser que as células-tronco implantadas no local da lesão ajudem na “modulação” do ambiente que foi danificado, através da liberação de fatores de crescimento. Esses, por sua vez, podem estimular as próprias células-tronco locais (ou circulantes) a regenerar aquele tecido. Com certeza, muitos estudos ainda devem ser realizados para o entendimento desses ou de outros mecanismos de funcionamento das células-tronco, ainda desconhecidos.

Ainda serão necessários alguns anos até que se possa usar com grande eficiência e em larga escala a terapia com células-troncos para diversas doenças. Novas terapias revolucionárias ainda deverão ser descobertas como, por exemplo, investigações usando células-tronco hematopoéticas que poderão contribuir para a construção de um fígado artificial e formação de tecidos hepáticos “*ex vivo*”, assim como a terapia

de transplante celular². No entanto, a medicina regenerativa, através do uso das células-tronco no tratamento de inúmeras doenças incuráveis, é uma esperança cada vez mais próxima ao alcance da humanidade.

REFERÊNCIAS

1. Stem Cell Information 2004. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/infocenter/stemCellBasics.asp>. Último acesso em 02/06/2005.
2. Lo K, Chuang W, Lamb D. Stem Cell Research: the facts, the myths and the promises. *J Urol* 2003; 170: 2453-8.
3. Vogel G. Stem cells: New Excitement, Persistent Questions. *Science* 2000; 290: 1672-74.
4. Forbes S, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci* 2002; 103: 355-69.
5. Alison M. Characterization of the Differentiation Capacity of Rat-Derived Hepatic Stem Cells. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 325-36.
6. Bongso TA, Fong CY, Ng CY, Ratnam SS. Blastocyst transfer in human in vitro: fertilization; the use of embryo co-culture. *Cell Biol Int* 1994; 18: 1181-9.
7. National Institutes of Health. Kirschstein R, Skirboll L. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, 2001. The Stem Cell. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/stemcell/pdfs/chapter1.pdf>. Último acesso em 02/06/2005.
8. National Institutes of Health. Kirschstein, R.; Skirboll, L. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, 2001. The Embryonic Stem Cell 2001. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/stemcell/pdfs/chapter2.pdf>. Último acesso em 02/06/2005.
9. Moore KL, Persaud TVN, Shiota K. Color atlas of clinical embryology. In: *The First Two Weeks of Human Development*. Chapter 1. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto; WB Saunders Company; 2000. p. 1-12.
10. Darlington G. Molecular mechanisms of liver development and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 678-82.
11. Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-5.
12. Alison, M. Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 385-87.
13. Michalopoulos G, DeFrances M. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276: 60-5.
14. Sell S. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 267-71.
15. Dabeva M, Shafritz D. Hepatic Stem Cells and Liver Repopulation. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 349-62.

16. Potten C, Loeffler M. Stem cell attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1999; 110: 1001-20.
17. Michalopoulos G, DeFrances M. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276: 60-5.
18. Grompe M. The Role of Bone Marrow Stem Cells in Liver Regeneration. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 363-70.
19. Alison M, Poulsom R, Forbes S. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001; 21: 367-73.
20. Mitaka T. Hepatic Stem Cells: From Bone Marrow Cells to Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1-5, 2001.
21. Theise N, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from Bone Marrow in Humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-6.
22. Alison M, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
23. Schwatz R, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
24. Faris R, Tamako K, Halpert G. Liver Stem Cells: A Potential Source of Hepatocytes for the Treatment of Human Liver Disease. *Int Soc Artif Organs* 2001; 25: 513-21.
25. Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-22.
26. Stamp L, Crosby HA, Hawes SM, Strain AJ, Pera MF. A novel cell-surface marker found on human embryonic hepatoblasts and a subpopulation of hepatic biliary epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 103-12.
27. Petersen B, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
28. Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, Beldi G, Quarta M, Gloor B, et al. Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg* 2005; 1: 69-74.
29. Lagass E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-34.
30. Huiling X, Inagaki M, Arikura J, Ozaki A, Onodera K, Ogawa K, et al. Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in albuminemic rat livers. *J Surg Res* 2004; 122: 75-82.
31. Lee KD et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-84.
32. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J M et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-74.
33. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004; 37: 97-110.
34. Feldmann RE Jr, Bieback K, Maurer MH, Kalenka A, Burgers HF, Gross B. Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis* 2005; 26: 2749-58.
35. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, et al. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-5.
36. Gotherstrom C, Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 239-45, 2004.
37. Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, Astrom G, Tammik C, Arner P, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 391-7.
38. Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 02-8.
39. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-61.
40. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang P, et al. Isolation and Identification of a Multilineage Potential Mesenchymal Cell from Human Placenta. *Placenta*. 2005, Sept 17. Available from URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16174531&dopt=Citation. Último acesso em 01/03/2007.
41. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200:123-35.
42. Alison M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 710-15.
43. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, et al. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 884-9.
44. Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, et al. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30.

45. Thorgeirsson S, Grisham J. Overview of Recent Experimental Studies on Liver Stem Cells. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 303-12.
46. Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 2006; 11: 1302-10.
47. Sell S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 467-82.
48. Saúde Pública. Biblioteca virtual em saúde. Portal FIOCRUZ de 21/09/2005. Brasil faz transplante com uso de células-tronco de medula óssea para problemas do fígado. Available from: URL: <http://saudepublica.bvs.br/noticias/?act=view&id=30>. Último acesso em 27/02/2007.
49. Radis. Fiocruz. Comunicação em Saúde, Nº 39, novembro de 2005, página 5. Células-tronco em socorro do fígado. Available from: URL: <http://www.ensp.fiocruz.br/radis/39/sumula.html>. Último acesso em 27/02/2007.
50. Gestão C & T, Brasília, 26 a 28 de setembro de 2005, Nº 410, Ano 6. Pesquisa com células-tronco realizada na Bahia gera resultado clínico inédito. Available from: URL: <http://www.gestaoct.org.br/electronico/jornais/numero410.htm>. Acesso em 27/02/2007.