



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA
DE SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LUIZ FLÁVIO MAIA DA SILVA

**USO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS (G-CSF) NA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM
CIRROSE HEPÁTICA**

Feira de Santana, BA
2009

LUIZ FLÁVIO MAIA DA SILVA

**USO DO FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIAS DE
GRANULÓCITOS (G-CSF) NA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DA MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM
CIRROSE HEPÁTICA**

Versão preliminar da dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, BA
2009

Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

À minha família - mãe, esposa e filha que ajudaram na superação das dificuldades do caminho.

À minha orientadora, Dra. Milena Botelho Pereira Soares pela amizade, estímulo e dedicação permanentes, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos pelo apoio e amizade.

Aos Drs. Luiz Guilherme Lyra e André Lyra pela confiança e inestimável ajuda na compreensão das doenças hepáticas.

Aos pacientes e suas famílias, pela esperança em dias melhores.

Ao Hospital São Rafael que proporcionou o suporte necessário à realização deste trabalho.

À CEHON (Centro de Hematologia e Oncologia da Bahia), sua diretoria e amigos que ajudaram de forma incondicional nos momentos mais difíceis.

À UEFS e à FIOCRUZ pelo empreendedorismo do seu Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Professor Aristóteles Neto pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa.

Aos queridos amigos Márcia Amaral, Rafael Vita, Cecília Luz, Neila Jones, Liliane Alcântara e Daniele Pereira pela amizade e colaboração, especialmente durante o ano de 2008.

Aos Drs. Augusto César de Andrade Mota e Dr. Marcos Fortes responsáveis pelo meu retorno ao laboratório de pesquisa.

Ao secretário do PPGBIOTEC, Helton Ricardo, por sua habilidade e gentileza em solucionar problemas.

À coordenadora de pesquisa clínica Carmem Silveira, pela sua valiosa contribuição na organização dos dados dos pacientes.

Às amigas, Renata Campos, Cristina Gil e Fernanda Borba, colegas de mestrado, pela amizade desde a primeira visita ao Campus da UEFS.

Aos colegas do LETI, professores, alunos e funcionários pelo convívio afável e por seus ensinamentos nas técnicas de laboratório.

A Daniel Vilas-Boas pela ajuda com os primeiros gráficos.

RESUMO

A cirrose hepática representa um estágio avançado e, até o momento, irreversível de dano ao fígado. O tratamento definitivo é o transplante hepático, porém o crescente aumento do número de pacientes em lista de espera por um transplante supera a quantidade de fígados doados, ocasionando uma alta taxa de óbito nesses pacientes. Torna-se necessário, portanto, o desenvolvimento de alternativas de tratamento capazes de aumentar a taxa de sobrevivência desses doentes enquanto aguardam a realização do transplante ou, se possível, até eliminar a necessidade de realização deste procedimento caso haja regeneração do órgão. Nesse sentido, estudos em modelos animais e ensaios clínicos com o uso de células mononucleares da medula óssea têm sido realizados e demonstram seu potencial regenerativo em patologias crônicas como Doença de Chagas e cirrose hepática. Outra potencial alternativa ao uso de células mononucleares da medula óssea é a mobilização dessas células precursoras através da utilização de um hormônio celular, o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), capaz de mobilizar as células progenitoras da medula óssea para o sangue periférico e daí chegar ao órgão lesionado e produzir efeitos regenerativos. Neste estudo foi realizado um ensaio clínico de fase I com o uso de G-CSF (filgrastima) em pacientes com doença crônica do fígado em estágio avançado, em lista de espera para transplante hepático, para avaliar a segurança e exequibilidade da filgrastima (G-CSF) nesses pacientes. Cinco pacientes selecionados receberam quatro ciclos de G-CSF, correspondendo a duas doses diárias do produto, durante cinco dias e seguidos durante quatro meses. Os pacientes foram monitorados com exame físico, exames de laboratório e ultrassonografia abdominal durante a fase de administração da medicação e com exame físico e exames de laboratório durante a fase de seguimento. Não ocorreram efeitos adversos importantes ao uso do G-CSF, exceto dores osteomusculares relacionadas à sua administração. No entanto, não foi observada modificação significativa de sua pontuação no escore de Child-Pugh ou MELD, bem como dos níveis de bilirrubina e albumina. Concluímos que o esquema terapêutico em ciclos repetidos de G-CSF (filgrastima) é seguro e exequível, em pacientes portadores de cirrose hepática crônica, com efeitos adversos de pequena intensidade e de fácil manejo, porém nossos resultados não indicam uma melhora na evolução da doença pelos critérios de Child-Pugh e MELD nos pacientes do estudo.

Palavras-chave: G-CSF, cirrose, transplante hepático, mobilização, terapia celular

ABSTRACT

Liver cirrhosis is an advanced stage and, so far, irreversible of damage to the liver. The definitive treatment is liver transplantation, but the increasing number of patients on the waiting list for a liver transplant and the low number of donated organs indicate the need for development of alternative therapies to increase survival rate of patients awaiting a transplant or even eliminate the need for transplantation. Thus, studies in animal models and clinical trials have been performed and suggest that treatment with bone marrow progenitor cells in chronic diseases in organs such as heart and liver is promising to regenerate the damaged organ. A possible alternative to cell therapy is the mobilization of precursor cells from bone marrow by using the cell hormone granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), which mobilizes progenitor cells from bone marrow to peripheral blood, through which these cells can reach the damaged organ. The present study is a phase I clinical trial using G-CSF (filgrastim) in patients with chronic liver disease in an advanced stage waiting for liver transplantation, designed to evaluate the safety and feasibility of the therapy in these patients. Five selected patients received four cycles of G-CSF, corresponding to two daily doses of G-CSF for five days, and were followed for four months. The patients were monitored by physical examination, laboratory tests and abdominal ultrasonography during the administration of G-CSF and with physical examination and laboratory tests during the follow-up. There were no significant adverse effects of the use of G-CSF, except for bone and muscles pain related to product administration. However, there were no significant changes in their Child-Pugh or MELD scores, neither bilirubin and albumin levels. We conclude that the treatment regimen in repeated cycles of G-CSF (filgrastim) is safe and feasible in patients with chronic liver cirrhosis, with adverse effects of low intensity and easy handling, although our results do not indicate an improvement in the severity of the disease by the criteria for Child-Pugh and MELD these patients with this treatment.

Keywords: G-CSF, cirrhosis, liver transplantation, mobilization, cell therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fígado normal (A) e com fibrose avançada (B)	12
Figura 2	Célula-tronco embrionária	17
Figura 3	Exemplos de fontes de células-tronco do indivíduo adulto	18
Figura 4	Modelo geral de hematopoiese	19
Figura 5	Ligação do G-CSF e ativação do receptor	22
Figura 6	Variação de leucócitos durante os ciclos de estimulação com filgrastima	33
Figura 7	Níveis séricos de bilirrubina	34
Figura 8	Níveis séricos de albumina	34
Figura 9	Variação do escore de Child-Pugh	35
Figura 10	Variação do escore MELD	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escore de Child-Pugh para avaliar gravidade da doença hepática	15
Tabela 2	Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e exames de imagem	28
Tabela 3	Características dos pacientes	30
Tabela 4	Parâmetros laboratoriais dos pacientes no 1º dia, um e cinco meses de estudo	31
Tabela 5	Variação do tamanho do baço nos ciclos (cm)	32
Tabela 6	Variação da leucometria (μl)	32
Tabela 7	Estudos com G-CSF (filgrastima e lenograstima) em pacientes com doenças hepáticas.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

VHC	Vírus da hepatite C
VHB	Vírus da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
MELD	Modelo para estágio final de doença hepática (model for end-stage liver disease)
TP	Tempo de protrombina
INR	Razão normatizada internacional (international normalized ratio)
G-CSFR	Receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
AST	Aspartato-aminotransferase
ALT	Alanina-aminotransferase
Gama-GT	Gama-glutamilttransferase
rh-G-CSF	Recombinante humano do fator estimulador de colônias granulocíticas
HGF	Fator de crescimento de hepatócito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	Doenças crônicas do fígado	12
2.2	Tratamento	14
2.3	Regeneração hepática	15
2.4	Terapia celular	16
2.5	Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)	21
3	OBJETIVOS	25
3.1	Geral	25
3.2	Específico	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Desenho do estudo	26
4.2	População do estudo	26
4.3	Critérios de inclusão	26
4.4	Critérios de exclusão	27
4.5	Fases de seleção e de exames pré-terapia	27
4.6	Terapia com G-CSF (filgrastima)	27
4.7	Tempo de seguimento	28
4.8	Avaliação dos eventos adversos da terapia	29
4.9	Avaliação da potencial eficácia da terapia celular	29
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	42
8	REFERÊNCIAS	43
9	ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

A cirrose representa um estágio avançado de doença hepática decorrente de dano crônico ao fígado, causado por diversas etiologias que se caracterizam anatomicamente pela fibrose septal e formação de nódulos no parênquima do órgão. Estima-se que 40% dos pacientes sejam assintomáticos, contudo o aparecimento de sinais e sintomas da doença leva a um quadro de progressiva debilidade física, queda do estado geral e da qualidade de vida, com repercussões no seu cotidiano, perda da capacidade para o trabalho e elevada taxa de mortalidade. No Brasil, em 1989 ocorreram 12363 mortes por cirrose hepática em adultos, a maioria em homens (80.4%), sendo que 75.4% dos pacientes do sexo masculino tinham entre 20 e 59 anos, o que representava 138860 anos produtivos de vida perdidos (LESSA, 1997).

A etiologia mais freqüente da doença crônica do fígado é o vírus C da hepatite (VHC), que representa 30 a 75% dos casos, de acordo com a região geográfica estudada (KEEFFE, 2001). A maioria dos pacientes infectados pelo HCV encontra-se assintomática, porém uma menor proporção desenvolve hepatite crônica, hipertensão portal e cirrose, notadamente quando há a associação com fatores de risco ou co-morbidades, tais como o álcool, vírus da hepatite B (VHB) e vírus HIV. Além disso, a taxa de incidência de hepatocarcinoma em pacientes cirróticos é de 4% ao ano nos EUA (DI BISCEGLIE, 2000), o que agrava mais a doença.

O transplante hepático é amplamente aceito como o método de tratamento padrão para a maioria dos pacientes com cirrose avançada e atinge taxas de sobrevida de cerca de 80% em três anos nos Estados Unidos (CÁRDENAS e GINÈS, 2008). Contudo, existe uma alta prevalência de doença crônica do fígado e uma pequena disponibilidade de doadores de órgãos, o que leva a um persistente aumento do número de pacientes na fila de espera. Mais de 16000 pacientes naquele país aguardam a realização do procedimento, enquanto que cerca de 6000 transplantes são realizados por ano (CÁRDENAS e GINÈS, 2008). Um estudo recente englobando os dados de pacientes dos anos de 2005 e 2006 estimou a taxa de mortalidade na fila de espera em cerca de 6% após três meses da admissão na fila, enquanto 28% foram submetidos ao transplante (KIM, 2008).

No Brasil e na Bahia essas taxas de mortalidade na fila de espera não são atualizadas frequentemente, mas a Secretaria de Saúde do Estado da Bahia informa, em seu endereço eletrônico na internet, que o número de doações de órgãos múltiplos, excluindo córnea, em 2008

foi de 46 e ocorreram 33 transplantes de fígado no mesmo período (COORDENAÇÃO DO SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES, 2009). A fila de espera, segundo outra página eletrônica da mesma fonte, totalizava 292 pacientes naquele ano (COORDENAÇÃO DO SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES, 2009).

A situação do Estado de São Paulo, onde é realizada a maioria dos transplantes hepáticos do Brasil, revela uma taxa de mortalidade na fila de 14,8%, no ano de 2008, enquanto 3429 pacientes aguardavam doação, até abril de 2008. Já no ano de 2006 haviam sido realizados 341 transplantes (SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES-SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO, 2009).

Fica claro, portanto, que a mortalidade na fila de espera é elevada em nosso meio, tornando necessárias melhorias nos programas de captação e distribuição de órgãos, bem como a realização de ensaios clínicos em busca de novas alternativas capazes de atenuar ou reduzir o grau de disfunção hepática e possibilitar uma redução da mortalidade dos pacientes enquanto aguardam o transplante (ALLEN, BUCK e WILLIAMSON, 2005). Uma possibilidade interessante nesse sentido é a utilização da terapia com células-tronco com o intuito de regenerar o parênquima danificado e restaurar a função do fígado cirrótico.

Nesse sentido, a terapia celular vem surgindo como uma potencial alternativa aos portadores de doenças crônico-degenerativas que acometem diferentes órgãos e tecidos como coração, nervos, músculos, rim, fígado (KÖRBLING et al., 2003). Em gastrohepatologia, alguns artigos demonstram o papel da infusão de células mononucleares da medula óssea em pacientes com cirrose hepática, com ou sem mobilização com fator estimulador de colônia (G-CSF) e discutem seus possíveis benefícios e mecanismos de ação (FORBES, 2007 e HOULIHAN, 2008).

Estudos realizados no Japão (TERAI et al., 2006), em nove pacientes portadores de cirrose hepática e na Bahia (LYRA et al., 2007), em dez pacientes com as mesmas características, demonstraram melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais, com efeitos adversos leves e de fácil manejo após a infusão de células mononucleares de medula óssea. Mais recentemente, um estudo controlado demonstrou que a melhora pós-transplante de células mononucleares é transitória (LYRA et al., no prelo).

O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é uma glicoproteína produzida por monócitos, fibroblastos e células endoteliais e sua principal função é induzir a proliferação e maturação de neutrófilos (AVALOS, 1996), embora outros efeitos sejam descritos em tecidos

não hematopoiéticos como induzir à proliferação e migração de células do endotélio vascular humano (BUSSOLINO et al., 1989) e induzir o crescimento de algumas linhagens tumorais de câncer de pulmão de pequenas células e carcinoma de cólon (AVALOS et al., 1990 e BERDEL et al., 1989). Seu potencial efeito na de terapia de doenças hepáticas agudas e crônicas foi demonstrado em laboratório (YANNAKI et al., 2005) e em seres humanos (YANNAKI et al., 2006).

A filgrastima, aprovada para comercialização nos Estados Unidos em 1991 pelo Food and Drug Administration, vem sendo empregada em larga escala na prática clínica há cerca de duas décadas, passado o temor inicial de que pudesse potencializar o crescimento de células tumorais.

Atualmente seu papel encontra-se consolidado como mobilizador de células-tronco hematopoiéticas em pacientes que serão submetidos a transplante autólogo de medula óssea, ou quimioterapia citotóxica, onde ocorre intensa neutropenia com elevado risco de infecções graves, ou em outras situações clínicas que podem cursar com neutropenia, como nos pacientes em uso de interferon para tratamento de hepatite viral crônica.

Um estudo de fase I/II (GAIA, 2006) utilizando lenograstima, uma forma glicosilada recombinante do G-CSF, em oito pacientes com cirrose hepática, na dose de 5 µg/kg/dia, duas vezes por dia, durante três dias, demonstrou a mobilização de células progenitoras da medula óssea e a redução de dois pontos na escala Child-Pugh em quatro pacientes, durante oito meses de seguimento.

No presente estudo foram investigadas a segurança, exequibilidade e potencial eficácia da terapia com G-CSF, de forma intermitente, em quatro ciclos de administração quinzenal, em cinco pacientes com cirrose hepática, escalas B e C de Child-Pugh, em lista de transplante de fígado do Hospital São Rafael. Esses pacientes foram seguidos durante quatro meses e seus dados clínicos e laboratoriais monitorados regularmente e comparados ao final do estudo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças crônicas do fígado

A fibrose hepática é uma resposta comum a diversas causas de agressão hepática crônica como, por exemplo, o álcool, infecções virais ou parasitárias e sobrecarga hereditária de metais. Apesar de sua etiologia, a fibrose hepática se caracteriza por um aumento dos constituintes da matriz extracelular que, conjuntamente, formam a cicatriz hepática (FRIEDMAN, 1993). A cirrose representa um estágio avançado de progressiva inflamação-cicatrização decorrente dessas agressões crônicas ao órgão, que se inicia como fibrose subendotelial ou pericentral e progride para uma fibrose septal pan-lobular que leva à formação de nódulos (BONIS et al., 2001) (figura 1).

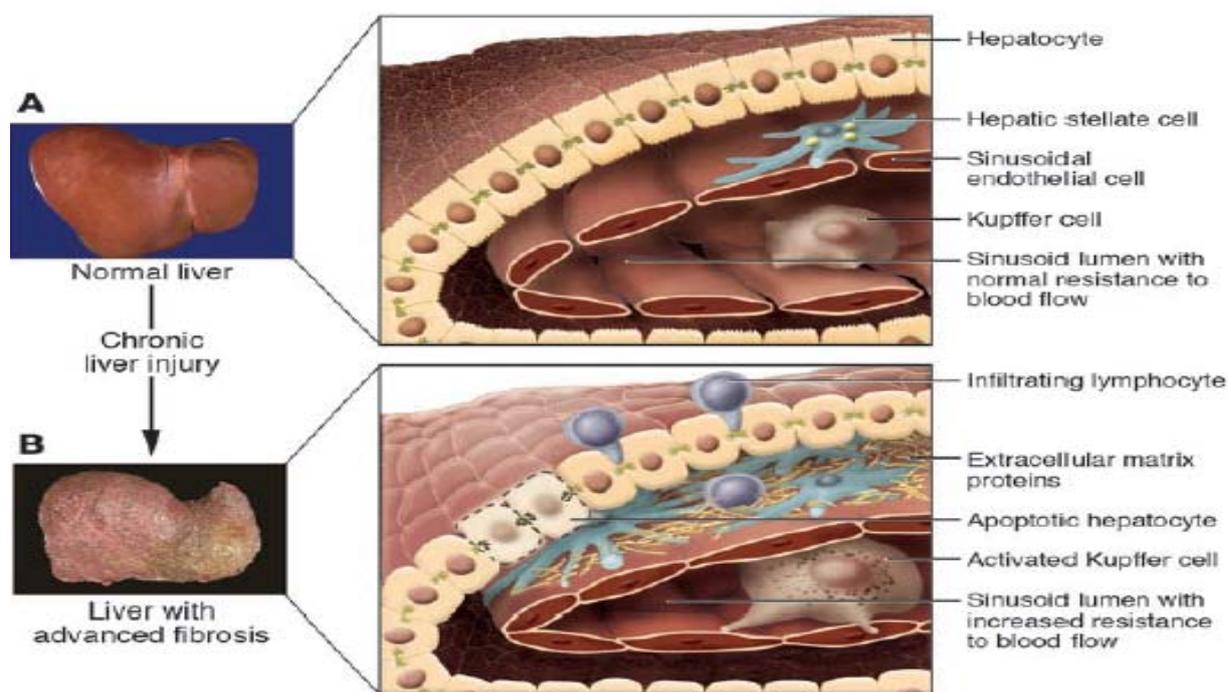


Figura 1. Fígado normal (A) e com fibrose avançada (B). Fonte: BATALLER e BRENNER, 2005.

Embora a fibrose hepática tenha sido considerada irreversível por mais de meio século, esse conceito de irreversibilidade começou a perder espaço nas últimas décadas baseado em estudos em esquistossomose, onde se demonstrou que extensa fibrose podia ser revertida, com restauração tanto morfológica como funcional do órgão (ANDRADE, 2005). Sabe-se também que a cessação do estímulo agressor é capaz de revertê-la, ao menos parcialmente, ou evitar que progrida até a cirrose, como se observa nos indivíduos que param o consumo etílico, ou tratam a esquistossomose em fase inicial, bem como naqueles com sobrecarga de ferro ou cobre (FRIEDMAN, 1993). Outros estudos corroboram essa afirmação, sendo interessante o ensaio demonstrando a reversão da fibrose hepática em seis pacientes, de onze estudados, com pancreatite crônica e estenose do duto biliar comum após drenagem biliar (HAMMEL et al., 2001).

Estima-se que 40% dos pacientes com cirrose sejam assintomáticos, nesses indivíduos o diagnóstico é estabelecido através de exames de rotina ou autópsia, contudo o aparecimento de sinais e sintomas da doença leva a uma progressiva deterioração clínica, com graves repercussões na sua vida cotidiana e profissional, associada à elevada taxa de mortalidade.

No Brasil, ocorreram 9350 óbitos por fibrose e cirrose hepática e 8882 por doença alcoólica do fígado, em 2007, último ano com informações disponíveis em meio eletrônico (DATASUS, 2009). Desse total, 14960 eram homens e 3272 mulheres, sendo 13771 óbitos na faixa etária entre 25 e 64 anos de idade, coincidindo com a fase de maior atividade produtiva. Na Bahia, foi registrado, no mesmo período, um total de 965 óbitos. Dados da Secretaria da Saúde do Estado (DIRETORIA DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE, 2009), disponíveis na internet, contabilizam um total de 503 óbitos relacionados exclusivamente à fibrose e cirrose hepática, em 2008, sendo que 384 ocorreram em pacientes do sexo masculino e 119, do sexo feminino e, desse total, 383 óbitos ocorreram na faixa etária entre 25 e 64 anos. Mais óbitos decorrentes de doença crônica do fígado foram catalogados em outros subgrupos de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (CID), o que pode subestimar os valores encontrados.

Lessa avaliou o impacto da mortalidade por cirrose hepática em adultos, em 1989, no Brasil, onde ocorreram 12363 mortes pela doença, sendo que 75,4% dos pacientes do sexo masculino tinham entre 20 e 59 anos de idade, o que representava 138860 anos produtivos de vida perdidos (LESSA, 1997).

A hepatite crônica pelo vírus C é a principal etiologia de cirrose hepática em indivíduos adultos no mundo ocidental e a principal indicação para transplante hepático, além de aumentar a incidência de hepatocarcinoma que é de 4% nos Estados Unidos (DI BISCEGLIE, 2000 e 2008). Ela representa 30 a 75% dos casos, de acordo com a região geográfica estudada (KEEFFE, 2001). A maioria dos pacientes infectados pelo HCV evolui para a forma crônica da doença, que se caracteriza por longos períodos assintomáticos (LAUER, 2001). Estima-se que 74 a 86 % dos pacientes mantêm viremia persistente (CONRY-CANTILENA et al., 1996).

Complicações severas e morte costumam ocorrer em pessoas com cirrose, cuja incidência é estimada em 15 a 20% dos infectados (EASL, 1999). Sua evolução torna-se mais agressiva quando existe associação com outros fatores de risco tais como o álcool, vírus da hepatite B (VHB) e vírus HIV.

2.2 Tratamento

Diferentemente da fibrose hepática, a reversibilidade da cirrose não é de fácil comprovação em seres humanos, mesmo quando estes indivíduos apresentam melhora clínica após suspensão ou redução do estímulo agressor, sendo melhor avaliada em ratos submetidos ao tratamento continuado com tetracloreto de carbono (CCl₄) ou com di-metil-nitrosamina (DMN), (ANDRADE, 2005).

O transplante hepático, nos pacientes com cirrose, ocorre na fase de descompensação da doença. Nessa situação, a reserva funcional hepática está tão comprometida que culmina no aparecimento de edema, ascite, icterícia, atrofia da musculatura, encefalopatia hepática e alterações laboratoriais: hipoalbuminemia < 3g/dl e prolongamento do tempo de protrombina (abaixo de 50% do controle). Nesta condição, a mortalidade é elevada nos primeiros dois anos, muitas vezes não havendo tempo hábil para se aguardar pelo transplante. A gravidade da doença hepática é universalmente avaliada pela classificação de Child-Pugh (tabela 1) e mais recentemente pela escala MELD (model for end-stage liver disease), desenvolvida para avaliação mais precisa dos pacientes encaminhados a transplante, onde tem prioridade os pacientes com maior gravidade, independente do tempo de espera na fila. Habitualmente os pacientes são transplantados nos estágios B e C de Child-Pugh, sendo que a expectativa de vida nesse último estágio da doença é de 1 a 3 anos, sem o transplante.

Tabela 1: Escore de Child-Pugh para avaliar gravidade da doença hepática.

Pontuação	1	2	3
Albumina (g/dl)	>3.5	2.8 – 3.5	< 2.8
Bilirrubina (mg/dl)	1-2	2-3	>3
Para doenças colestáticas: Bilirrubina (mg/dl)	<4	4-10	> 10
TP (segundos a mais) ou INR *	1-4	4-6	>6
Ascite	Ausente	Discreta	Moderada
Encefalopatia (grau)	Ausente	1 e 2	3 e 4

Classe	Total de pontos
A	5-6
B	7-9
C	10-15

*Tempo de protrombina (TP) ou international normalized ratio (INR) podem ser usados

2.3 Regeneração hepática

Sabe-se que o fígado possui uma grande capacidade regenerativa. Após estímulo adequado a regeneração do órgão se inicia, primeiramente através da divisão celular dos hepatócitos maduros e não através de uma população de célula-tronco específica. Depois de uma hepatectomia de 2/3 do órgão, a maioria dos hepatócitos entra em ciclo celular e mitose, de tal forma que a massa celular pode ser restabelecida com uma média de menos de dois ciclos de divisão, embora alguns hepatócitos pareçam apresentar uma capacidade intrínseca de até 70 vezes (OVERTURF et al., 1997). A perda excessiva de células associada à lesão crônica do órgão, como na hepatite viral, ou quando a replicação do hepatócito é impedida como na esteatohepatite, a regeneração parece ocorrer através de um compartimento celular secundário (TATEMATSU et

al., 1984; EVARTS et al., 1989). Este compartimento celular continua mal definido e parece ser proveniente de uma população de células pouco diferenciadas dentro dos ramos terminais da árvore biliar intralobular, os canais de Hering (PAKU et al., 2001). Essas células em roedores são denominadas células ovais, mas em seres humanos são comumente denominadas células progenitoras hepáticas (ROSKAMS et al., 2004).

Estudos iniciais em humanos sugeriram que algumas células intra e extra-hepáticas possuíam propriedades de células-tronco hepáticas e podiam se diferenciar em hepatócitos ou células epiteliais de ducto biliar (HAQUE et al., 1996; THEISE et al., 1999; YASUI et al., 1997). Utilizando o cromossoma Y como marcador, um pequeno número de hepatócitos pareceu se originar da medula óssea em um receptor masculino de um transplante ortotópico do fígado de um doador do sexo feminino, o mesmo ocorreu em algumas pacientes do sexo feminino que receberam transplante de medula óssea de doador masculino e depois desenvolveram doença hepática (THEISE et al., 2000).

2.4 Terapia celular

O interesse pelo papel regenerativo desempenhado pelas células-tronco vem crescendo nos últimos anos bem como o debate ético em torno do seu emprego em pesquisa clínica. Existem dois tipos de células-tronco, as embrionárias e as células-tronco do organismo adulto. As primeiras encontram-se presentes na massa interna do embrião, na fase de blastocisto, (figura 2), são pluripotentes, capazes de se auto-regenerar e de se diferenciar em vários tipos celulares dependendo das condições de cultivo (TURKSEN, 2002). Outra característica dessas células é que elas podem ser re-introduzidas em embriões de camundongo, dando origem a células de todos os tecidos do animal adulto, inclusive a células germinativas (ROBERTSON et al., 1986).

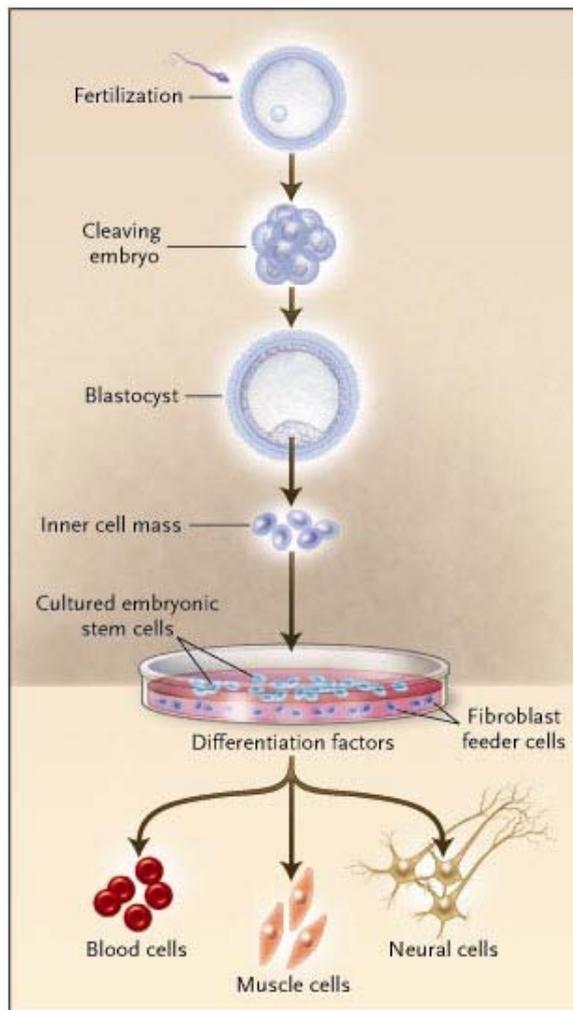


Figura 2. Célula-tronco embrionária. Fonte: GEARHART, 2004.

Existem evidências do desenvolvimento de neoplasias com o uso de células-tronco embrionárias em animais de laboratório (CHINZEI, 2002; CHOI, 2002) e recentemente foi relatado o caso de um paciente que desenvolveu tumores no sistema nervoso central depois de repetidas infusões de células-tronco embrionárias para tratamento de ataxia-telangiectasia, uma rara desordem neurológica que leva à degeneração da área cerebral responsável pela fala e pelos movimentos (AMARIGLIO et al., 2009). Isso causou temor na sociedade quanto à segurança na utilização desse tipo de célula e demonstrou a necessidade de maior compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no seu funcionamento

As células-tronco nos organismos adultos, presentes em vários órgãos e tecidos (figura 3) tem a capacidade de auto-regenerar determinados tecidos como a pele, o epitélio intestinal e o sangue, que tem suas células constantemente destruídas e renovadas num complexo mecanismo de proliferação e diferenciação celular (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 2004).

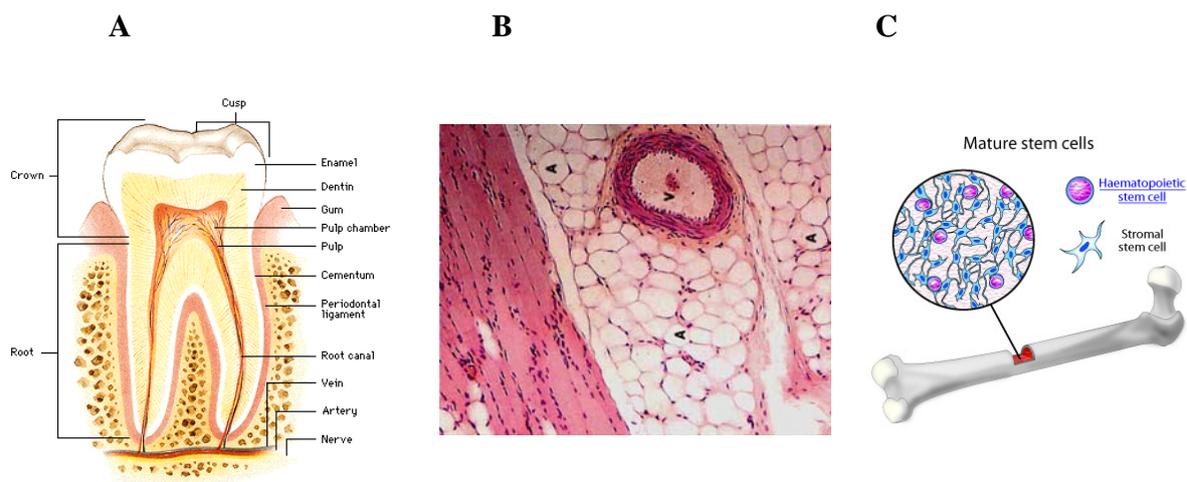


Figura 3. Exemplos de fontes de células-tronco do indivíduo adulto. A, polpa dentária; B, tecido adiposo e C, medula óssea.

A hematopoiese, estudada há várias décadas e de grande importância para o entendimento das doenças hematológicas fornece um bom exemplo do complexo processo de divisão e diferenciação celular onde se observa que a partir de células-tronco multipotentes de medula óssea há uma sucessiva produção de células cada vez mais diferenciadas até chegarem ao sangue periférico como células adultas (figura 4).

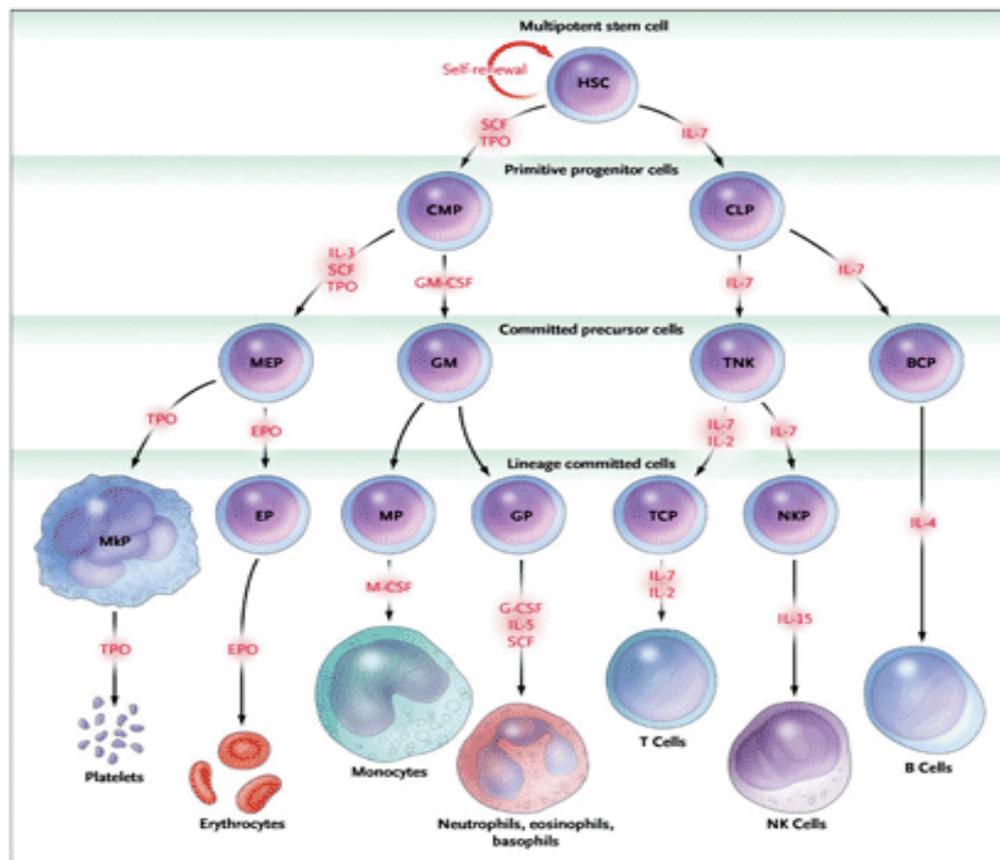


Figura 4. Modelo geral de hematopoiese. Fonte: KAUSHANSKY, 2006.

Sabe-se que alguns órgãos têm um estoque de células-tronco com limitada capacidade de regeneração após lesão, como o fígado, músculo esquelético, pâncreas e sistema nervoso (KRAUSE, 2002). Contudo, a capacidade pluripotente dessas células em poder gerar outras de órgãos e tecidos diferentes do qual se originaram, foi demonstrado, primeiramente, por um grupo de cientistas italianos (FERRARI et al., 1998) que conseguiram regenerar células de músculo esquelético a partir de células de medula óssea.

Os transplantes alogênicos e autogênicos de medula óssea, em portadores de doenças hematopoiéticas, se constituem opções terapêuticas seguras e consolidadas na prática médica do uso de células-tronco desde 1950 (PEREIRA, 2008). Sua obtenção é relativamente simples e seu emprego freqüente demonstrou-se seguro ao longo dos anos, sem acarretar maiores problemas ao doador, uma vez que o tecido possui uma alta taxa de renovação celular. Sua utilidade em terapia

celular vem crescendo devido ao seu potencial papel na regeneração de outros órgãos. Vários trabalhos têm demonstrado o papel da medula óssea como fonte produtora de células progenitoras multipotentes capazes de gerar uma variedade de tipos celulares (ALISON et al., 2000; BRAUN et al., 2000; LAGASSE et al., 2000).

Estudos em seres humanos portadores de cardiopatia chagásica crônica (VILAS-BOAS et al, 2006) e doença isquêmica coronariana (SCHÄCHINGER et al., 2006) têm demonstrado melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo após infusão de células progenitoras derivadas da medula óssea na artéria coronária.

Em neurologia, outras possíveis aplicações clínicas das células-tronco são os quadros de traumatismo raqui-medular (CHERNYKH et al, 2007) com secção de fibras neurais e no acidente vascular cerebral (BANG et al, 2005), cuja extensão da área atingida e o tipo de lesão envolvida, isquêmica ou hemorrágica podem levar a quadros incapacitantes de paralisia.

Em endocrinologia, o principal objetivo é o tratamento do diabetes insulino-dependente em que não há produção desse hormônio pelas células das ilhotas pancreáticas (NOGUCHI, 2007). Em outras áreas clínicas, vários estudos demonstram o potencial de células-tronco em pneumologia, oftalmologia, urologia, nefrologia, ortopedia e angiologia (BYDŁOWSKI et al., 2009).

Estudos em modelos animais de doença hepática mostraram que o transplante de células da medula óssea pode acelerar o processo de regeneração do fígado, reduzir a fibrose, melhorar sua função e aumentar a taxa de sobrevivência (FANG et al., 2004; SAKAIDA et al., 2004; SAKAIDA et al., 2005). Em roedores, existem evidências tanto de uma trans-diferenciação da célula-tronco de medula óssea em hepatócito como em fusão entre os dois tipos celulares (VASSILOPOULOS et al., 2003; JANG et al., 2004).

Devido à facilidade de obtenção e manipulação das células-tronco de medula óssea, alguns trabalhos foram realizados usando essa fonte de células progenitoras, autólogas, em pacientes com cirrose hepática. Um estudo realizado no Japão (TERAI et al., 2006), em nove pacientes, Child-Pugh B e C, com coleta de 400 ml de medula óssea do íliaco e re-infusão em sangue periférico das células mononucleares da medula óssea após processo de separação laboratorial, demonstrou melhora dos parâmetros clínicos e laboratoriais, sem efeitos adversos, exceto febre no dia do procedimento.

Outro estudo, realizado no Hospital São Rafael (LYRA et al., 2007) avaliou a segurança e exequibilidade do uso de células mononucleares da medula óssea em dez pacientes portadores de doença hepática crônica, Child-Pugh B e C, em lista de transplante hepático. A coleta de medula óssea foi realizada nos ilíacos, sob anestesia, em centro cirúrgico e cerca de 50 ml foram obtidos. Após separação e enriquecimento das células mononucleares, estas eram infundidas na artéria hepática. Houve redução dos valores de bilirrubina e INR (international normalized rate), aumento da taxa de albumina sérica durante o período de seguimento e confirmou tratar-se de um procedimento seguro.

Os efeitos da infusão de células mononucleares de medula-óssea autóloga na artéria hepática de pacientes portadores de doença crônica do fígado demonstraram melhora transitória da função hepática (LYRA et al., no prelo). Isto sugere a necessidade de mais de uma infusão de células para um efeito terapêutico mais duradouro e significativo.

Apesar desses estudos não terem relatado eventos adversos significativos na coleta e infusão de medula óssea, o risco potencial de complicações anestésicas, infecciosas e hemorrágicas nesses pacientes não pode ser desconsiderado, bem como os custos envolvidos com hospitalização, medicamentos, hemoderivados, coleta e separação de células mononucleares da medula óssea e de cateterização da artéria hepática não serem desprezíveis.

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

O fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) se constitui em uma família de glicoproteínas inicialmente identificadas pela sua capacidade de manter a proliferação clonal de células progenitoras hematopoiéticas *in vitro* (STANLEY, 1977 e NICOLA et al., 1983). Esses fatores também são capazes de estimular a diferenciação de células de modo linhagem específico (GASSON et al., 1984). Em meio de cultura semi-sólido, o G-CSF estimula a formação de colônia neutrofílica de células de medula óssea de camundongos e humanos, além de induzir a diferenciação de células leucêmicas mielóides (NICOLA et al., 1983).

As atividades biológicas do G-CSF são mediadas por um receptor específico na superfície celular das células respondedoras. Esse receptor (G-CSFR) está presente em células progenitoras mielóides, células de leucemia mielóide, neutrófilos maduros, plaquetas, monócitos e algumas células linfóides T e B. Além dessas células da linhagem hematopoiética, receptores para G-CSF

são encontrados em diversos tipos celulares não-hematopoiéticos, incluindo células endoteliais, placenta, células trofoblásticas e algumas linhas de células de câncer de pulmão (AVALOS, 1996) (figura 5).

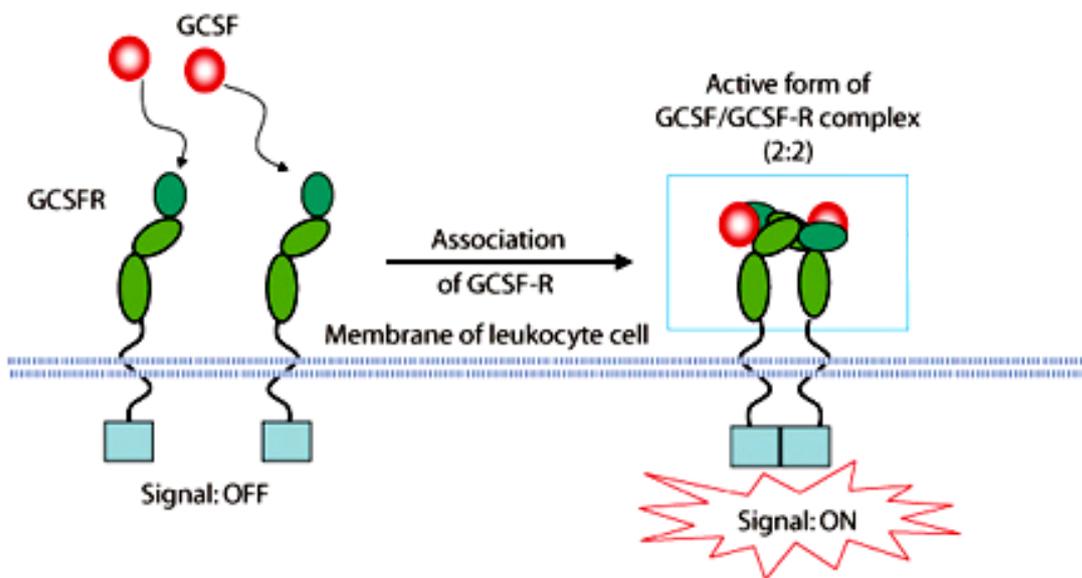


Figura 5: Ligação do G-CSF e ativação do receptor. Fonte: TAMADA et al, 2006.

Produzido por monócitos, fibroblastos e células endoteliais, o G-CSF possui múltiplas funções na hematopoiese, tais como a regulação da produção e liberação dos neutrófilos da medula óssea, da proliferação e diferenciação dos progenitores dos neutrófilos e o controle do estado de ativação dos mesmos (ZSEBO, 1986 e WELTE, 1987). Produzido através de técnicas de engenharia genética, o G-CSF recombinante está disponível na forma glicosilada (lenograstima) e não glicosilada (filgrastima) (BRONCHUD et al, 1988).

Doses farmacológicas do G-CSF demonstraram atividade em várias situações clínicas tais como neutropenia idiopática, mielossupressão induzida por quimioterapia, recuperação da aplasia após transplante de medula óssea e mobilização de células progenitoras hematopoiéticas para a circulação periférica com ou sem quimioterapia prévia (LIESCHKE, et al., 1992).

Atualmente, o papel desta citocina é bem conhecido e ela é rotineiramente utilizada em pacientes que serão submetidos a transplante de medula óssea autogênico (TARELLA et al., 1999). Sabe-se que células $CD34^+$, precursoras das células hematopoiéticas, que habitualmente

são encontradas na medula óssea, podem migrar para a corrente sanguínea após terapia estimulante com G-CSF, em número suficiente para serem coletadas por técnicas de aférese e depois re-infundidas, com a finalidade de reconstituir a população celular da medula.

Estudos em terapia celular e regeneração hepática demonstraram o papel do G-CSF no reparo celular de hepatopatia aguda e crônica em camundongos, melhorando a sobrevivência e o aspecto histológico do fígado de animais previamente lesionados com produtos químicos, principalmente por promover mecanismos de reparo endógeno (YANNAKI et al., 2005). Outro estudo demonstrou que a mobilização com G-CSF em camundongos com lesão hepática induzida pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄) aumentava a presença de hepatócitos derivados de medula óssea (QUINTANA-BUSTAMANTE et al., 2006), sugerindo um potencial efeito regenerativo no órgão.

Estudos subsequentes optaram pela utilização do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) como agente mobilizador de células progenitoras da medula óssea para o sangue periférico que, uma vez coletadas através de técnicas de aférese, foram reinfundidas nos pacientes através da veia periférica (YANAKI et al., 2006), veia porta ou artéria hepática (GORDON et al., 2006). Nestes trabalhos foram observados variados graus de melhora, embora o número de pacientes avaliados tenha sido pequeno e o tempo de seguimento, menor do que um ano.

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), outra citocina capaz de mobilizar células hematopoiéticas, bem como o G-CSF, também foram empregados em ensaios experimentais em animais de laboratório e em pacientes com infarto agudo do miocárdio (TAKAHASHI et al., 1999; INCE et al., 2005), embora com resultados conflitantes, apontam para a necessidade de maiores estudos, com randomização de pacientes.

Em seres humanos, o uso do G-CSF ganhou impulso no tratamento de diversas condições clínicas associadas à neutropenia, como após quimioterapia citotóxica nos pacientes oncológicos, nos pacientes portadores de hepatite viral em uso de interferon, em outras causas de neutropenia adquiridas e em transplantes autólogos, conforme já referido anteriormente.

Sua administração demonstrou-se segura, eficaz no combate à neutropenia e com raros relatos de complicações graves como ruptura esplênica (FALZETTI et al., 1999) e oclusão de stent coronariano após infusão de células-tronco de sangue periférico mobilizadas com G-CSF (KANG, 2004). Seus efeitos colaterais são habitualmente bem tolerados e incluem dores ósseas,

cefaléia, artralgias e náuseas, geralmente controlados com a interrupção da medicação ou uso de sintomáticos.

Em pacientes com hepatopatia crônica, um estudo com G-CSF foi realizado em oito pacientes com cirrose avançada, escala de Child-Pugh B e C, (GAIA, 2006). Após um seguimento de oito meses, foi observado que a administração de G-CSF mostrou-se segura, mobilizou células de medula óssea que expressavam marcadores de células epiteliais e de células-tronco e, embora fosse um estudo preliminar, houve melhora clínica nos pacientes tratados que evoluíram com menor incidência de encefalopatia, ascite e queda na pontuação da escala MELD. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre a melhora na classificação de Child-Pugh e MELD e o número de células mobilizadas pela administração do G-CSF.

3 OBJETIVOS

Geral:

Realizar um estudo clínico com a administração de G-CSF, em 4 ciclos, em pacientes com doenças crônicas do fígado.

Específicos:

- Avaliar a segurança e exequibilidade do uso da filgrastima (G-CSF) em 4 ciclos, em pacientes com cirrose hepática em lista de transplante de fígado.

- Investigar o potencial benefício da administração de 4 ciclos de G-CSF, através da avaliação clínica e da função hepática dos pacientes tratados.

4 CASUÍSTICA

4.1 Desenho do estudo

Estudo clínico de fase I/II, aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael (processo 07/07).

4.2 População do estudo

Foram selecionados cinco pacientes com diagnóstico de insuficiência hepática crônica, avançada, procedentes do ambulatório de fígado do Hospital São Rafael.

4.3 Critérios de inclusão

- Idade entre 18 e 65 anos;
- Pacientes com insuficiência hepática crônica avançada de qualquer etiologia com indicação de transplante hepático que se encontrem na lista de transplante hepático do Hospital São Rafael e sem indicação para realização de terapia celular através da coleta e infusão de células mononucleares da medula óssea;
- Ausência de evidências clínicas, laboratoriais ou radiológicas de carcinoma hepatocelular ou colangiocarcinoma;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Comprimento do baço menor que 18 cm, no maior eixo, à ultrassonografia.

4.4 Critérios de exclusão

- Sepsis
- Vigência de encefalopatia hepática;
- Neoplasias malignas (exceto câncer de pele não melanoma);
- Insuficiência cardíaca descompensada;
- Doenças hematológicas primárias;
- Insuficiência renal moderada (creatinina acima de 2 mg/dl);
- Dependência de suporte orgânico, como choque circulatório ou ventilatório;
- Baço maior que 18 cm, no maior eixo, à ultrassonografia

4.5 Fases de seleção e de exames pré-terapia

Todos os pacientes foram submetidos à triagem clínica com obtenção de anamnese e exame físico, exames laboratoriais com a determinação da classificação de Child-Pugh e MELD. A avaliação laboratorial inicial foi feita com hemograma, proteínas totais e albumina, bilirrubinas, tempo de protrombina, INR, fibrinogênio, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama-GT, sódio, potássio, uréia, creatinina, glicemia e alfa-fetoproteína. Todos os pacientes realizaram uma ultra-sonografia e uma ressonância magnética abdominal para avaliar o comprimento do baço e afastar tumor hepático. Foram considerados válidos os exames laboratoriais dos últimos 30 dias e exames de imagem dos últimos três meses.

4.6 Terapia com G-CSF (filgrastima)

Os pacientes incluídos no estudo fizeram uso de filgrastima (Laboratório Biosintética Ltda., São Paulo, Brasil), 10 mcg/kg/dia, divididas em duas doses diárias, durante cinco dias e descanso de nove dias, no total de quatro ciclos. As doses eram aplicadas por via subcutânea, sendo que a primeira dose dos dias 1, 3 e 5 eram administradas no ambulatório do Hospital São Rafael, após avaliação médica e laboratorial e as demais no domicílio, aplicadas pelos pacientes ou seus familiares, com posterior devolução das ampolas, vazias, utilizadas;

- foram monitorados com exame físico, exames de laboratório (hemograma, proteínas totais e albumina, bilirrubinas, tempo de protrombina, INR, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama-GT, sódio, potássio, uréia, creatinina) e ultrassonografia abdominal;

- o uso do G-CSF deveria ser suspenso em caso de elevação dos leucócitos acima de 70.000/ μ l, piora da função hepática ou em caso de efeitos adversos que não fossem controlados com sintomáticos;

- após o término do programa de administração da filgrastima, os pacientes foram mantidos em observação mensal ou em menor período de tempo, conforme a necessidade de cada caso, com os mesmos exames já descritos, pelo período de três meses, para avaliação de resposta.

4.7 Tempo de seguimento e cronograma de tratamento e avaliações

Os pacientes foram avaliados nos dias 1, 3 e 5 de cada ciclo de aplicação de G-CSF quando eram realizadas novas avaliações clínicas e laboratoriais e depois nos dias 30, 60 e 90 após o último ciclo de tratamento, perfazendo um total de cinco meses de estudo a partir do início do primeiro ciclo de tratamento, conforme tabela 2, abaixo:

Tabela 2. Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e exames de imagem

PROCEDIMENTO	D 1	D 3	D 5	D 60	D 90	D 120
ANAMNESE E EXAME FÍSICO	X	X	X	X	X	X
HEMOGRAMA	X	X	X	X	X	X
PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES	X		X	X	X	X
BILIRRUBINAS	X		X	X	X	X
TEMPO DE PROTROMBINA	X		X	X	X	X
AST ¹	X		X	X	X	X
ALT ²	X		X	X	X	X
FOSFATASE ALCALINA	X		X	X	X	X
GAMA GT ³	X		X	X	X	X
SÓDIO	X		X	X	X	X
POTÁSSIO	X		X	X	X	X
URÉIA	X		X	X	X	X
CREATININA	X		X	X	X	X
GLICOSE	X		X	X	X	X
USG ABDOME SUPERIOR	X	X	X			

1- AST- aspartato-aminotransferase; 2- AST- alanina-aminotransferase; 3- GAMA GT- gama-glutamilttransferase

4.8 Avaliação dos eventos adversos da terapia

Foram considerados eventos adversos relacionados à terapia os efeitos indesejáveis observados, relacionados ou não à administração da medicação, no período de 30 dias após a aplicação da filgrastima. Foi considerado agravamento da função hepática um aumento de dois pontos no escore da classificação de Child-Pugh.

4.9 Avaliação da potencial eficácia da terapia celular

A potencial eficácia da terapia com G-CSF foi avaliada pela comparação da função hepática antes e depois do tratamento. Foi considerada melhora clinicamente significativa da função hepática uma diminuição em dois pontos na classificação de Child-Pugh.

5 RESULTADOS

Foram avaliados 10 pacientes no período de agosto de 2007 a janeiro de 2008. Cinco pacientes foram excluídos: dois em decorrência de tumor hepático, dois em virtude de apresentarem esplenomegalia maior que 18 cm e um faleceu no período de realização de exames de triagem.

Foram realizados vinte ciclos de G-CSF, dos vinte propostos inicialmente e 174 ampolas do medicamento foram administradas, de um total de 200 previstas para uso. O paciente ASF recebeu somente dois ciclos do medicamento e 20 ampolas foram aplicadas, em virtude de ter falecido durante o período de estudo. O paciente JAR recebeu 34 ampolas de G-CSF, das 40 propostas em razão de ter sido internado e por isso foi descontinuado o uso da medicação.

A idade dos pacientes estudados variou entre 45 e 59 anos, todos eram do sexo masculino, dois apresentavam cirrose decorrente de hepatite crônica pelo vírus C, dois eram portadores de doença alcoólica do fígado (DAF) e um deles apresentava hepatite crônica pelo vírus C associada a cirrose alcoólica. Três pacientes apresentavam classificação de Child-Pugh B e um C, enquanto a classificação MELD variou entre 13 a 19, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Características dos pacientes à admissão do estudo.

Pacientes	Idade	Sexo	Etiologia	Child-Pugh	MELD	Baço
ASF	51	M	HCV ¹	C (10)	19	13,4 cm
ACSB	49	M	HCV	B (8)	16	16 cm
JAR	45	M	DAF ²	B (9)	13	15,9 cm
CAS	49	M	DAF	B (7)	15	13,1 cm
ATC	59	M	HCV + DAF	B (9)	19	16,5 cm

1- HCV- vírus da hepatite C; 2- DAF- doença alcoólica do fígado

Os parâmetros laboratoriais dos pacientes estudados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros laboratoriais dos pacientes no 1º dia, 1 mês e cinco meses de estudo.

	ASF	ACSB	JAR	CAS	ATC	Média geral	Varição média (%)
Hemoglobina (g/dl)							
Basal	13,3	13,7	13,4	13,2	13,4	13,40	-
1 mês	-	12,4	13,1	11,6	12,5	12,40	-7,46
5 meses	-	12,5	10,4	13,3	12,4	12,15	-9,33
Leucócitos (x10³)							
basal	5900	4300	5100	7100	4100	5300,00	-
1 mês	-	12500	37400	38100	3600	22900,00	332,08
5 meses	-	4100	5800	6400	3400	4925,00	-7,08
GGT (U/)							
basal	92	85	113	79	113	96,40	-
1 mês	-	108	98	79	115	100,00	3,73
5 meses	-	61	-	75	142	92,67	-3,87
AST (U/L)							
basal	71	79	63	130	42	77,00	-
1 mês	-	78	70	99	37	71,00	-7,79
5 meses	-	67	-	142	48	85,67	11,26
ALT (U/L)							
basal	50	53	43	83	33	52,40	-
1 mês	-	44	52	68	34	49,50	-5,53
5 meses	-	44	-	95	35	58,00	10,69
Bilirrubina (mg/dL)							
basal	2,55	4,48	2,43	1,32	1,58	2,47	-
1 mês	-	2,47	4,4	0,97	1,81	2,41	-2,41
5 meses	-	6,09	2,07	1,39	1,17	2,68	8,41
Albumina (mg/dL)							
basal	2,6	3,6	4,2	3,6	3,6	3,52	-
1 mês	-	3,2	4,3	3,1	3,6	3,55	0,85
5 meses	-	3,2	-	3,3	3,4	3,30	-6,25
INR (unid)							
basal	1,71	1,47	1,43	1,45	1,27	1,47	-
1 mês	-	1,94	1,43	1,46	1,29	1,53	4,37
5 meses	-	1,81	1,5	1,39	1,32	1,51	2,66
Creatinina (mg/dL)							
basal	1	0,9	1,1	2,2	1,2	1,28	-
1 mes	-	0,9	1,2	1,6	1,3	1,25	-2,34
5 meses	-	0,9	1,2	1,5	1,4	1,25	-2,34
Sódio (mmol/L)							
basal	-	140	136	136	136	137,00	-
1 mes	-	141	128	135	134	134,50	-1,82
5 meses	-	144	138	138	140	140,00	2,19

O baço sofreu aumento do seu comprimento em todos os pacientes, no terceiro dia da aplicação da filgrastima, até o máximo de 21,2 cm no paciente CAS, no terceiro dia do primeiro ciclo de tratamento, mas não causou queixas de dor ou desconforto abdominal e retornou aos valores prévios no D5 (tabela 5).

Tabela 5. Variação do tamanho do baço nos ciclos (cm).

Pacientes	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	ciclo 4
ASF	13,4 - 14,8	13 - 15	-	-
ACSB	16 - 17,2	16 - 16,2	16 - 16,3	16 - 17,1
JAR	15,9 - 17,4	16 - 16,6	15,6 - 17	15,8 - 17
CAS	13 - 21	11,5 - 12,9	12,7 - 13,1	12,9 - 13,8
ATC	15,2 - 16,9	15,7 - 16,2	13,7 - 18,2	13,7 - 15,6

A leucometria elevou-se em todos os pacientes e atingiu seu valor máximo também no paciente CAS, no terceiro dia do quarto ciclo de G- CSF, atingindo 67800 leucócitos/ μ l, sem quaisquer sinais ou sintomas relatados pelo paciente e redução desses valores a 43700 leucócitos/ μ l, no D 5, não sendo necessária a interrupção da medicação (tabela 6).

Tabela 6. Variação da leucometria (μ l).

Pacientes	ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3	ciclo 4
ASF	5900 - 32300	5000 - 54300	-	-
ACSB	4300 - 21600	5200 - 27100	4200 - 31000	3900 - 33700
JAR	5100 - 31700	6600 - 46700	8100 - 40400	7700 - 52200
CAS	7100 - 42300	6500 - 41600	7000 - 61100	8500 - 67800
ATC	4100 - 13500	4300 - 15600	3600 - 14800	3800 - 16700

Houve grande variação da leucometria entre os ciclos de aplicação do G-CSF, sendo observado que os pacientes ASF, CAS e ATC atingiram valores acima de 40.000 leucócitos/ μ l em alguns momentos, enquanto ACSB apresentou valores entre 20000 e 40000 leucócitos/ μ l e JAR sequer alcançou 20000 leucócitos/ μ l, conforme demonstrado nos gráficos abaixo (figura 6).

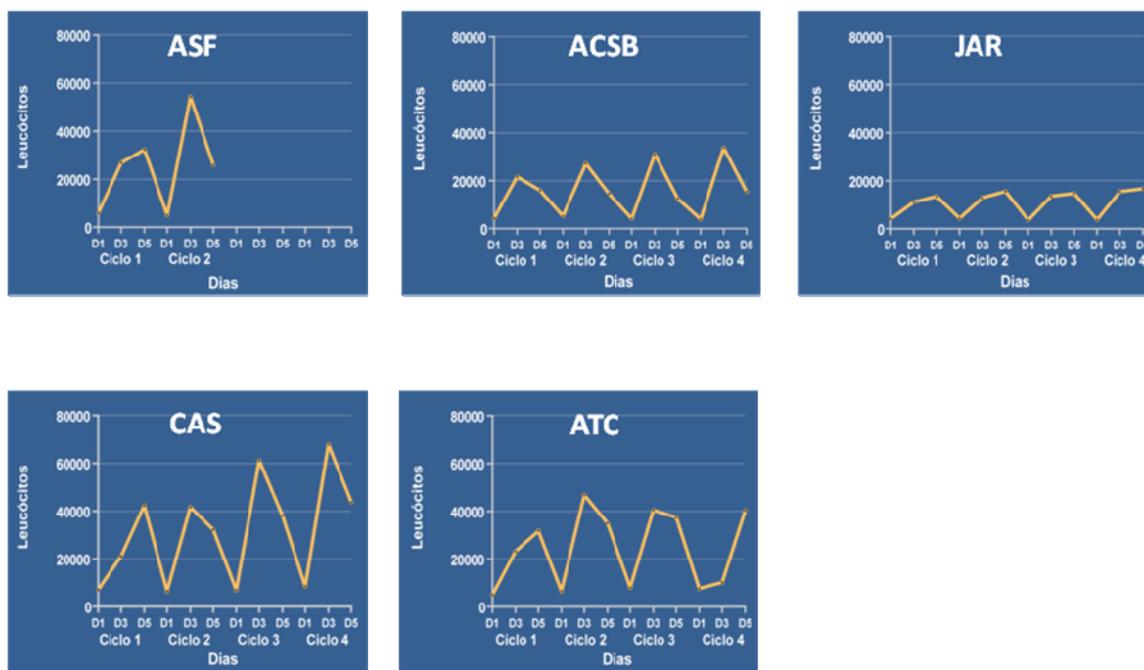


Figura 6: Variação de leucócitos durante os ciclos de estimulação com filgrastima.

O paciente ASF faleceu no intervalo entre os ciclos dois e três do G-CSF, em decorrência de choque séptico secundário a complicação de celulite do membro inferior, adquirida no intervalo entre os ciclos de G-CSF, em seu domicílio. Como também apresentava obesidade e recorrentes episódios de erisipela e encefalopatia hepática, não atribuímos esse evento adverso sério à possíveis efeitos da medicação, mas sim a complicações inerentes à sua própria condição clínica.

Houve importante oscilação nos níveis séricos de bilirrubinas nos paciente ACSB e JAR (figura 7), contudo a albumina se manteve praticamente estável, com exceção de uma elevação atípica e isolada no paciente ATC, no D 25 (figura 8).

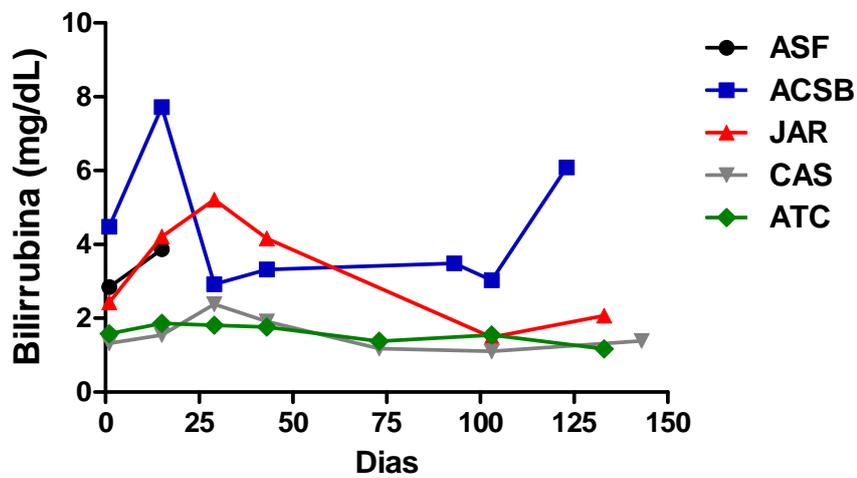


Figura 7. Níveis séricos de bilirrubina. (Normalidade: 0 a 1 mg/dL)

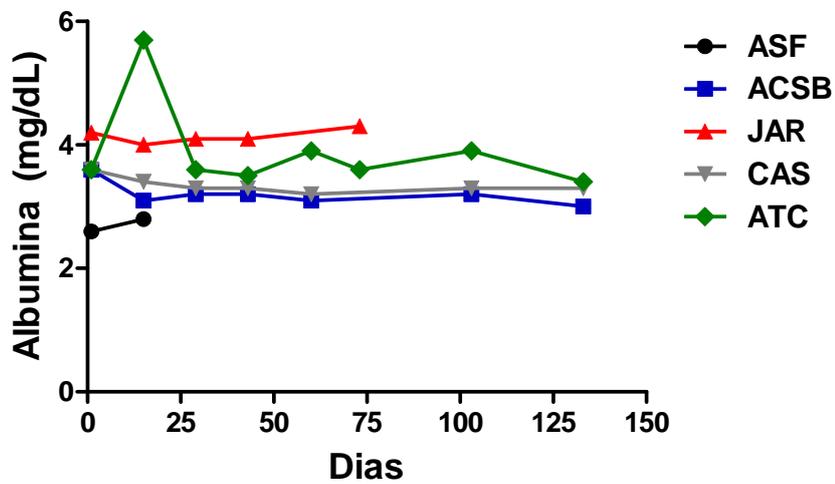


Figura 8. Níveis séricos de albumina. (Normalidade: 3,4 a 4,8 mg/dL)

As pontuações nas escalas Child-Pugh (figura 9) e MELD (figura 10) não mostraram modificações significativas durante o período do estudo.

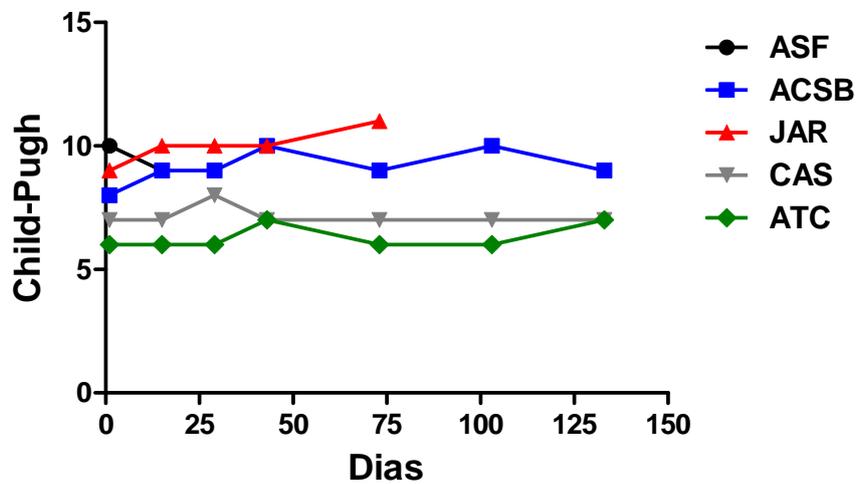


Figura 9. Variação do escore de Child-Pugh.

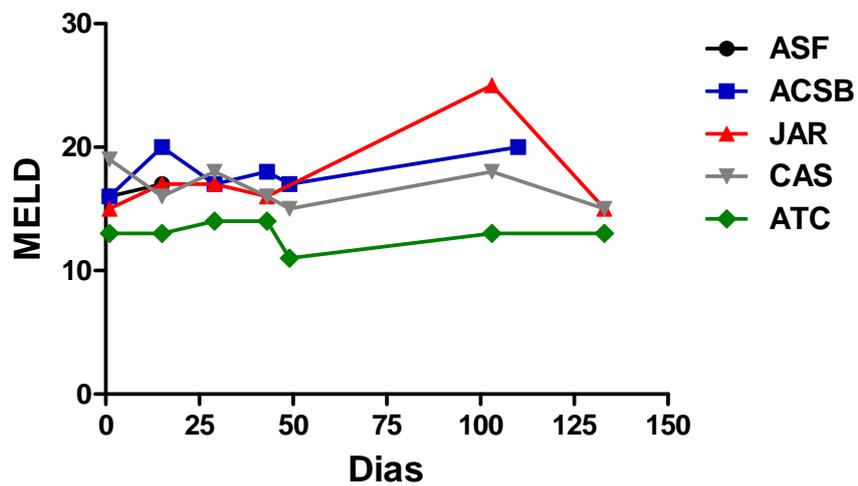


Figura 10. Variação do escore MELD.

Outros parâmetros laboratoriais e dados ultrassonográficos usados no acompanhamento dos pacientes não mostraram variação importante, contudo o paciente JAR evoluiu com piora progressiva da ascite e episódios de encefalopatia hepática, no primeiro dia do quarto ciclo de G-CSF, que necessitaram interrupção da medicação e internamento para controle, onde realizou paracentese de alívio.

Todos os pacientes referiram dores ósteo-musculares e na região lombar de leve a moderada intensidade durante o período de uso da medicação, de fácil controle com o uso de analgésicos não opióides. Um deles referiu dores mais intensas e necessitou atendimento em unidade de emergência (JAR). Cãimbras e edema de membros inferiores também foram relatados, mas esses achados são comuns nos pacientes cirróticos. Um paciente referia cefaléia crônica, anterior ao início do estudo que se manteve durante o período de acompanhamento, sendo difícil definir a contribuição do G-CSF no quadro clínico.

6 DISCUSSÃO

A evolução da doença hepática crônica em pacientes em lista de transplante de fígado, sobretudo em países em desenvolvimento, é extremamente desfavorável, e é freqüente o óbito antes da cirurgia por diversos fatores relacionados à piora da função hepática, tais como infecções, desidratação, encefalopatia e outras co-morbidades associadas. Essa evolução desfavorável justifica a busca de novas modalidades terapêuticas que possam retardar a progressão da cirrose ou mesmo evitar o transplante hepático, caso uma nova terapia seja capaz de regenerar o órgão e restabelecer ou melhorar sua função.

Nosso estudo contou com uma amostra pequena de pacientes, reduzida ainda mais com o óbito de um deles antes do término do estudo. Poucas análises definitivas podem ser concluídas com relação à evolução clínica e laboratorial dos pacientes, contudo algumas considerações importantes devem ser feitas.

Observamos que houve uma grande variabilidade na pontuação da escala de Child-Pugh durante o período do estudo, independente do uso da filgrastima. Tais variações podem ser decorrentes do uso rotineiro de medicações como diuréticos, laxativos, antibióticos ou outros, além de dieta ou infecções, comuns a esses pacientes. Contudo, apesar dessa variabilidade, observamos uma tendência de estabilidade do escore de Child-Pugh dos pacientes CAS e ATC, enquanto ACSB e JAR aumentaram sua pontuação, apesar deste último ter sido avaliado para este critério somente até o D 75, em virtude de internamentos frequentes.

Dois de nossos pacientes, ASF e JAR apresentavam antecedentes de intercorrências clínicas freqüentes, relacionadas ou não à doença hepática crônica. O primeiro era obeso, tinha insuficiência venosa periférica e episódios recorrentes de erisipela e encefalopatia hepática. Durante o intervalo entre os ciclos dois e três do estudo, teve diagnóstico de celulite na coxa direita, sendo transferido de sua cidade para Salvador e internado no Hospital São Rafael, onde evoluiu com choque séptico e óbito. O segundo possuía ascite de difícil controle clínico e realizava paracentese de alívio com certa regularidade, além de apresentar episódios de encefalopatia e distúrbios psiquiátricos que motivavam seu internamento. Os outros três pacientes estudados não necessitaram internamentos, paracentese de alívio, cuidados médicos de emergência, nem receberam albumina, embora todos estivessem em uso de diuréticos.

O uso da filgrastima foi bem tolerado, com poucos efeitos adversos e todos de fácil manejo. Sua facilidade de administração e sua dispensação para uso domiciliar, foi responsável pela aderência dos pacientes ao estudo e redução dos custos do projeto, quando comparados com o estudo italiano (GAIA, 2006), onde os pacientes eram internados para receberem a medicação.

Um paciente (JAR) relatou dor intensa durante a utilização do produto, que motivou sua ida ao serviço de atendimento médico de urgência, onde foi medicado e internado, com adequado controle dos sintomas.

O aumento máximo do número de leucócitos, de 67800/ μ l, bem como do baço, de 21,2 cm, não ocasionou quaisquer sintomas físicos, e ambos os parâmetros retornaram espontaneamente aos seus valores basais até o quinto dia de cada ciclo de tratamento. Esses achados estão de acordo com outros estudos em que foi realizada a mobilização pelo tratamento com G-CSF (GAIA, 2006 e YANNAKI, 2006)

Os valores médios de albumina, bilirrubina e da pontuação das escalas de Child-Pugh e MELD também sofreram pequenas oscilações não significativas. A avaliação das células CD34⁺ mobilizadas não foi realizada em todos os pacientes, em virtude de dificuldades técnicas no preparo das células para análise por citometria de fluxo e, portanto, não puderam ser incluídas em nossa análise.

O uso de filgrastima está consolidado na prática médica contemporânea em diversas situações clínicas que levam à neutropenia. Outros fatores estimuladores de colônia de granulócitos (G-CSF) e granulocítico-macrofágico (GM-CSF) têm sido usados em estudos de mobilização de células progenitoras da medula óssea com o intuito de avaliar seu potencial regenerativo em diferentes órgãos previamente lesionados. Em cirrose hepática, outra forma do fator estimulante de colônia de granulócitos, a lenograstima, também tem sido empregada, tanto de forma isolada quanto para mobilização e coleta das células mobilizadas e posterior infusão. Diferentes doses e duração do tratamento com G-CSF foram testadas, bem como diferentes respostas obtidas (tabela 7).

Tabela 7. Estudos com G-CSF (filgrastima e lenograstima) em pacientes com doenças hepáticas.

Autores	Número de pacientes/sexo	Child-Pugh / MELD	G-CSF	Doses	Número de dias	Resposta avaliada
GAIA (2006)	8 M/F ¹ (5/3)	CP ² ≥ 9 M ³ >10	lenograstima	5 µg/kg, 12/12 h	3 dias	4 pctes ⁴ com ↓ 2 pontos na escala Child-Pugh
LEVICAR (2008)	5 M/F (4/1)	CP A-B	lenograstima e coleta HSC ⁵	520 µg/dia	5 dias	4 pctes↑ albumina 3 pctes com ↓ bilirrubina
YANNAKI (2006)	2 M/F	CP 8-12 M 14-23	G-CSF e coleta HSC	10 µg/kg	4-5 dias (3 ciclos)	melhora duradoura
LORENZINI (2008)	18 M/F (17/1)	CP 5-9 M 7-17	lenograstima e coleta HSC (3 pctes)	2-15 µg/kg	7 dias	não avaliada
SPAHR (2008)	13 M/F (11/2) + 11 pctes controle	CP 7-11 M 13-22	filgrastima	10 µg/kg	2x/dia 5 dias	sem benefício clínico
SILVA* (2009)	5 M/F(5/0)	CP 7-10 M 13-19	filgrastima	10 µg/kg	2x/dia 5 dias (4 ciclos)	sem benefício clínico

1-M/F - masculino/feminino; 2- CP - Child-Pugh; 3- M – MELD; 4- pctes – pacientes; 5- HSC – hematopoietic stem cell;

* O estudo aqui apresentado.

Nosso estudo não teve a mesma resposta obtida (melhora clínica) com o uso de lenograstima (GAIA, 2008). Neste último foi demonstrado um aumento significativo da população de células CD34⁺ após estimulação com G-CSF, durante três dias de uso, com mediana variando de 1,43/µl antes da administração a 19,33/µl, no terceiro dia do estímulo. Esses valores foram mais baixos do que aqueles verificados em voluntários sadios submetidos à mobilização com G-CSF que foi de 36,89 /µL. Contudo, observamos que a leucometria mediana dos pacientes

desse estudo foi de 20000 / μ l, enquanto que quatro de nossos pacientes atingiram cifras maiores que 20000 / μ l, sendo que três deles atingiram mais de 40000/ μ l, chegando até 67800 / μ l.

Em nosso estudo não foi possível avaliar o número de células CD34⁺ no sangue periférico, mas seria improvável supor que não houve mobilização adequada de células precursoras uma vez que a leucometria foi maior em nossos pacientes do que no estudo anterior.

Um estudo semelhante realizado em cinco pacientes com cirrose e mobilização de células progenitoras de medula óssea usando lenograstima na dose de 520 μ g (microgramas), diariamente, durante cinco dias e posterior coleta das células mobilizadas e subsequente infusão na veia porta ou artéria hepática demonstrou que o aumento da leucometria indicou a mobilização de células progenitoras em todos os pacientes (LEVICAR et al., 2008).

Discute-se o efeito da lenograstima versus filgrastima na prática clínica e em ensaios de laboratório, embora ambas sejam proteínas recombinantes de G-CSF, algumas diferenças existem entre elas. A purificação e clonagem molecular do G-CSF foi realizada na metade dos anos 1980 e o primeiro recombinante humano (rh-G-CSF) desenvolvido foi a filgrastima, aprovada para uso clínico nos Estados Unidos em 1991, em pacientes em tratamento quimioterápico (WELTE, et al., 1996). Ela é produzida em *Escherichia coli* e, diferentemente da molécula natural de G-CSF, não possui resíduos de açúcares em sua estrutura, embora seja muito semelhante em sua sequência de aminoácidos e na sua conformação estérica (KUBOTA et al., 1990). Sua potência tem sido descrita como a mesma que a do G-CSF natural (SOUZA, et al, 1986). A maioria dos dados clínicos disponíveis com G-CSF foi obtida com filgrastima. A lenograstima está licenciada para uso na Europa e Japão desde 1993 e é produzida nas células de ovário de hamster chins, que são capazes de fazer a glicosilação da proteína, como a molécula de G-CSF natural (KUBOTA et al., 1990). Assim, a lenograstima é mais semelhante ao G-CSF natural. Um estudo randomizado comparou as duas substâncias químicas para tratamento de neutropenia decorrente de quimioterapia, em crianças com câncer, na dose de 250 μ g/m² e detectou a mesma atividade dos dois recombinantes (BÖNIG, et al. 2001). Contudo, a estabilidade molecular da forma glicosilada do G-CSF confere atividade biológica mais prolongada, conforme sugerido em um estudo *in vitro* (QUEROL et al., 1999).

Um estudo avaliando a mobilização de células progenitoras hematopoiéticas em pacientes com esteato-hepatite alcoólica foi realizado em 24 pacientes usando doses de filgrastima de 5 µg/kg/dia, durante cinco dias, em duas aplicações subcutâneas diárias. Os pacientes foram sublocados em dois subgrupos, sendo 13 no braço da filgrastima e 11 no grupo controle, sendo posteriormente reavaliados para histologia do fígado, número de células CD34⁺, citocinas, testes de função hepática e evolução clínica. Os resultados revelaram que houve mobilização adequada de células CD34⁺, aumento na dosagem do fator de crescimento de hepatócito (HGF) em mais de 212% e aumento de cerca de 50% na taxa de proliferação de células progenitoras hepáticas, em favor do grupo tratado com G-CSF, embora não se tenha observado melhora da função hepática (SPARH, et al., 2008).

O mecanismo pelo qual as células-tronco extra-hepáticas regeneram o fígado ainda é motivo de controvérsias, a possibilidade de transdiferenciação em hepatócitos ou fusão das células-tronco extra-hepáticas com os hepatócitos remanescentes tem sido debatida (LAGASSE et al. 2000, TERADA et al, 2002; WANG et al., 2003 e VASSILOPOULOS et al., 2003), porém sem uma clara evidência a favor de um ou outro.

Outra hipótese sobre o modo como ocorreria a recuperação da função hepática é a de que as células progenitoras da medula óssea agem através da liberação de fatores de crescimento que promoveriam a regeneração do órgão, com redução da fibrose ou com a formação de novos vasos sanguíneos (KALLIS, et al., 2007).

Por fim, vale ressaltar que os pacientes incluídos em nosso estudo têm quadro clínico grave, em decorrência de um processo crônico de lesão ao fígado. Portanto, deve-se considerar a possibilidade de utilização de terapia celular em estágios menos avançados da doença, com o objetivo de retardar ou bloquear a evolução da lesão quando a função do órgão não se encontra ainda comprometida. Para esse fim, uma terapia baseada na administração de um hormônio celular, tal como o G-CSF, seria de grande interesse por ser menos invasiva do que a coleta e administração de células-tronco.

7 CONCLUSÕES

7.1- Nosso estudo demonstrou segurança e exequibilidade no uso da filgrastima (G-CSF) em ciclos repetidos.

7.2- Não houve indicação de que este tratamento foi capaz de produzir melhoras clínicas ou laboratoriais nos pacientes testados.

7.3- Os ensaios clínicos com G-CSF têm demonstrado segurança, porém sem consenso quanto aos benefícios do tratamento em pacientes com doenças crônicas do fígado. Novos estudos controlados, randomizados e duplo-cegos, com maior número de indivíduos pesquisados, são necessários para a demonstração dos potenciais benefícios desta citocina.

8 REFERÊNCIAS

ALISON, M. R.; et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, v. 406, n. 6793, p. 257, 2000.

ALLEN, K. J.; BUCK, N. E.; WILLIAMSON, R. Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl. Immunol.*, v.15, p. 99-112, 2005.

AMARIGLIO, N.; et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *P.Lo.S. Med.*, vol. 6, n. 2, e1000029, 2009.

ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38, n.6, p 514-520, 2005.

AVALOS, B.R.; et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. *Blood*, v.75, p. 851 - 857, 1990.

AVALOS, B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, v. 88, p. 761-777, 1996.

BANG, O.Y.; et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.*, v. 57, n. 6, p. 874-82, 2005.

BATALLER, R.; BRENNER, D.A.; Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.

BONIS, P.A.L.; FRIEDMAN, S.L.; KAPLAN, M.M. Is liver fibrosis reversible? *N. Eng. J. Med.*, v.344, n.6, p. 452 – 454, 2001.

BERDEL, W.E.; et al. Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood*, v. 73; p. 80 - 83, 1989.

BÖNIG, H.; et al. Glycosylated vs non-glycosylated granulocyte colony-stimulant factor (G-CSF) – results of a prospective randomized monocentre study. *Bone Mar. Transp.*, v.28, p. 259 – 264, 2001.

BRONCHUD, M.H.; et al. Phase I/II study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients receiving intensive chemotherapy for small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*, v. 56, p. 809 - 813, 1987.

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

BYDLOWSKI, S.P.; et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 31, supl. 1, p. 25 - 35, 2009.

CÁRDENAS, A.; GINÈS, P. Predicting mortality in cirrhosis - serum sodium helps. *N. Engl. J. Med.*, v. 359, n.10, p. 1060-1062, 2008.

CHERNYKH, E.R.; et al. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v. 143, n. 4, p. 543-547, 2007.

CHINZEI, R.; et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology*, v. 36, n. 1, p. 22-29, 2002.

CHOI, D.; et al. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transpl.*, v.11, n. 4, p. 359-368, 2002.

CONRY-CANTILENA, C.; et al. Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. *N. Eng. J. Med.*, v. 334, p. 1691-1696, 1996.

COORDENAÇÃO DO SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES. Disponível em:
<http://www.saude.ba.gov.br/transplantes/modules/mastop_publish/?tac=Estat%EDsticas>.
Acesso em: 28/06/2009.

COORDENAÇÃO DO SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES. Disponível em:
<http://www.saude.ba.gov.br/transplantes/modules/mastop_publish/?tac=Fila_de_Espera>.
Acesso em: 28/06/2009.

CRAWFORD, J.; et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 325, p.164 -170, 1991.

DATASUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def>>.
Acesso em: 09/08/2009.

DI BISCEGLIE, A.M. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology*, v.31, n. 4, p. 1014-1018, 2000.

DI BISCEGLIE , A.M.; et al. Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low-dose peginterferon. *N. Eng. J. Med.*, v. 359, n. 23, p. 2429 - 2441.

DIRETORIA DE INFORMAÇÃO EM SAÚDE. Disponível em:<
<http://www.saude.ba.gov.br/cgi/tabcgi.exe?tabnet/sim/obtba.def>>. Acesso em: 08/08/2009

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. *J. Hepatol.*, v. 30, p. 956-961, 1999.

EVARTS, R.P.; et al. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res.*, v. 49, n. 6, p.1541-1547, 1989.

FALZETTI, F.; et al. Spontaneous rupture of spleen during peripheral blood stem-cell mobilisation in a healthy donor. *Lancet*, v. 353 , n. 9152 , p. 555. 1999.

FANG, B.; et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*, v. 4, n. 78, p. 83-88, 2004.

FERRARI, G.; et al. Muscle regeneration by bone-marrow derived myogenic progenitors. *Science*, v. 279, p. 1528-1530, 1998.

FRIEDMAN, S.L. The cellular basis of hepatic liver fibrosis – mechanisms and treatment strategies. *N.Eng. J. Med.*, v. 328, n. 25, p. 1828-1835, 1993.

GAIA, S.; et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J. Hepatol.*, v. 45, n. 1, p. 13-19, 2006.

GASSON, J.C.; et al. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science*, v. 226, p.1339 - 1342, 1984.

GEARHART, J. *N. Engl. J. Med.*, v. 350, p.1275-1276, 2004.

GORDON, M.Y.; et al. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells*, v. 24; n. 7, p.1822-1830, 2006.

HAMMEL, P.; et al. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N. Eng. J. Med.*, v. 344, n.6, p. 418 - 423, 2001.

HAQUE, S.; et al. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab. Invest.*, v. 75, n. 5, p. 699-705, 1996.

HOULIHAN, H.C.; NEWSOME, P.N. Clinical advances in liver, pancreas, and biliary tract - critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology*, v. 135, p. 438-450, 2008.

INCE, H.; et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony stimulating factor. *Circulation*, v. 112, n. 20, p. 3097-3106, 2005.

JANG, Y.Y.; et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell. Biol.*, v. 6, n. 6, p. 532-539, 2004.

KALLIS, Y. N.; ALISON M.R.; FORBES S. J. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut*, v.56, p.716-724, 2007.

KANG, H. J.; et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomized clinical trial. *Lancet*, v. 363, p. 751-756, 2004.

KAUSHANSKY, K. *N. Engl. J. Med.*, v. 354, p. 2034-2045, 2006.

KEEFFE, E. B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology*, v. 120, n. 3, p. 749-762, 2001.

KIM, W. R.; et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *N. Engl. J. Med.*, v.359, n.10, p. 1018-1026, 2008.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. M. Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.*, v.349, p.570-582, 2003.

KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Therapy*, v. 9, p. 754-758, 2002.

KUBOTA, N.; et al. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulant factors. *J. Biochem.*, v. 107, p. 486 - 492, 1990.

LAGASSE, E.; et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, v. 6, n.11, p. 1229-1234, 2000.

LAUER, G. M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. *N. Eng. J. Med.*, v.345, n. 1, p. 41-52, 2001.

LESSA, I. Cirrhosis of the liver in Brazil: mortality and productive years of life lost prematurely. *Rev. Panam. Sal. Pub. /Pan. Am. J. Pub. Health*, v. 1, n. 2, p. 125-132, 1997.

LEVICAR, N.; et al. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. *Cell proliferation*, v. 41, sup. 1, p. 115- 125, 2008.

LIESCHKE, G. J.; BURGESS, A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N. Engl. J. Med.*, v. 327, p. 28 - 35, 1992.

LORENZINI, S.; et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 27, n.10, p. 932 - 939, 2008.

LYRA, A.C.; et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J. Gastroent.*, v. 13, n. 7, p. 1067-1073, 2007.

LYRA, A.C.; et al. Autologous bone marrow mononuclear cells infusion via hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: A pilot randomized controlled study. *Eur. J. Gastr. and Hepatol.*, in press

NICOLA, N.A.; et al. Purification of factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 9017 - 9023, 1983.

NOGUCHI, H. Stem cells for the treatment of diabetes. *Endocr. J.*, v. 54, n. 1, p. 7-16, 2007.

OVERTURF, K., et al. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, v. 151, n. 5, p. 1273-1280, 1997.

PAKU, S.; et al. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in the rat liver. *Am. J. Pathol.*, v. 158, n. 4, p.1313-1323, 2001.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública, *Ciência & Saúde Col.*, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

QUEROL, S.; et al. Effect of glycosylation of recombinant human granulocytic colony-stimulating factor on expansion cultures of umbilical cord blood CD34+ cells. *Haematologica*, v. 84, p. 493 - 498, 1999.

QUINTANA-BUSTAMANTE, O.; et al . Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*, v. 43, n. 1, p. 108-116, 2006.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; SOARES, M. B.P; CARVALHO, A. C. C.. Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, n. 6, p. 490-495, 2004.

ROBERTSON, E.; et al. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, v. 323, p. 445-448, 1986.

ROSKAMS, T.A.; et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reaction in human livers. *Hepatology*, v. 39, n. 6, p.1739-1745, 2004.

SAKAIDA, I.; et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, v. 40, n. 6, p. 1304-1311, 2004.

SAKAIDA, I.; et al. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med. Mol. Morphol.*, v. 38; n. 4, p. 197-202, 2005.

SCHÄCHINGER, V.; et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.*; v. 355, n.12, p. 1210-1221, 2006.

SISTEMA ESTADUAL DE TRANSPLANTES-SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Disponível em:
http://www.saude.sp.gov.br/content/cidadao_extras_servicos_informacoes_orientacoes_transplantes_mortalidade_lista_espera_orgao.mmp
http://www.saude.sp.gov.br/content/cidadao_extras_servicos_informacoes_orientacoes_transplantes_lista_espera.mmp>
http://www.saude.sp.gov.br/content/cidadao_extras_servicos_informacoes_orientacoes_transplantes_realizados.mmp; Acesso em: 28/06/2009.

SOUZA, L.M.; ET AL. Recombinant human granulocyte colony-stimulant factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*, v. 232, p. 61 - 65, 1986.

SPAHR, L.; et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology*, v. 48, p. 221-229, 2008.

STANLEY, E.R.; HEARD, P. Factors regulating macrophage production and growth. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 4305 - 4312, 1977.

TAKAHASHI, T.; et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.*, v. 5, n. 4, p. 434-438, 1999.

TAMADA, T.; et al. Homodimeric crossover structure of the human GCSF-Receptor signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.103, p.3135-3140, 2006.

TARELLA, C.; ZALLIO, F.; CARACCIOLO, D. Hemopoietic progenitor cell mobilization and harvest following an intensive chemotherapy debulking in indolent lymphoma patients. *Stem Cells*, v. 17, n.1, p. 55–61, 1999.

TATEMATSU, M., et al. Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am. J. Pathol.*, v. 114, n.3, p.418-30, 1984.

TERADA, N.; et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, v. 416, p. 542 - 545, 2002.

TERAI, S.; et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*, v. 24; n.10, p. 2292-2298, 2006.

THEISE, N. D.; et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*, v. 30, n. 6, p. 1425-1433, 1999.

THEISE, N.D.; et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, v. 32, n. 1, p. 11-16, 2000.

TURKSEN, K. Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols. In: Troy TC, Turksen K (eds) *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, v. 185, 2002.

VASSILOPOULOS, G; Wang, P; Russel, D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nat. Med.*, v. 422, n. 6934, p. 901-904, 2003.

VILAS-BOAS, F.; et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 87, n. 2, p. 159-166, 2006.

WANG, X.; et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, v. 422, p. 897 - 901, 2003.

WELTE, K.; et al. Recombinant human G-CSF: effects on hematopoiesis in normal and cyclophosphamide treated primates. *J. Exp. Med.*, v. 165, p. 941 - 948, 1987.

WELTE, K.; et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first ten years. *Blood*, v. 88, p. 1907-1929, 1996.

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

YASUI, O.; et al. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology*, v. 25, n.2, p. 329-334, 1997.

ZSEBO, K.M.; et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: molecular and biological characterization. *Immunobiology*, v. 172, p.175 - 184, 1986.

9. ANEXOS

Anexo 1: Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, Oliveira SA, Braga EL, de Carvalho WA, Genser B, dos Santos RR, Lyra LG. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2007 13(7):1067-1073.

Anexo 2: Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, Silva AG, Brustolim D, Genser B, Dos Santos RR, Lyra LG. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009 (no prelo).