



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MARCOS FRAGA FORTES

**TERAPIA CELULAR PELO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇA
PARENQUIMATOSA CRÔNICA DE FÍGADO**

FEIRA DE SANTANA - BA

2008

MARCOS FRAGA FORTES

**TERAPIA CELULAR PELO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇA
PARENQUIMATOSA CRÔNICA DE FÍGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

FEIRA DE SANTANA - BA

2008

MARCOS FRAGA FORTES

**TERAPIA CELULAR PELO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇA
PARENQUIMATOSA CRÔNICA DE FÍGADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

BANCA EXAMINADORA:

Nome - Orientador

Julgado em: ____ / ____ / ____

CONCEITO: _____

A Deus, por me guiar e permitir que pudesse concluir este trabalho

A pessoa a quem já dedico minha vida, a minha amada esposa Gabriela Noronha Fortes, motivo e motivação para minha caminhada.

Aos meus filhos Gabriel, Marcos e Sophia com todo meu amor, razões maiores da minha existência, que me fazem sempre caminhar sem medo da escuridão.

Aos meus pais Vicente e Ely, responsáveis por me estruturarem como homem e como pessoa.

Aos meus sogros Demócrito e Helena pelo acolhimento e dedicação.

Aos meus Irmãos Vicente e Isabel, por estarem ao meu lado desde a infância me apoiando e ensinando.

Aos meus cunhados e sobrinhos pelo carinho e atenção.

Aos meus queridos avôs Benedito e Tito, e às minhas avós Irene e Maria Isabel por estarem me esperando em glória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em nome de Jesus:

Aos meus orientadores e exemplos, Professores Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos e a Dra. Milena Botelho Pereira Soares, responsáveis pelo êxito desta caminhada;

Ao Professor Dr. Luiz Guilherme Costa Lyra, que conduziu sabiamente o estudo, com competência e perseverança;

Ao Dr. André Castro Lyra, amigo e parceiro;

A Sheilla A. Oliveira, que pacientemente me ensinou muito sobre trabalhos experimentais;

Aos companheiros Luiz Flávio Maia da Silva, André Goyanna Pinheiro Silva, Augusto César de Andrade Mota, Eduardo Lorens Braga, Wilson Andrade de Carvalho, Bernd Genser e Roberto Barroso;

Agradeço em especial ao grande amigo Dr. Rogério Medrado, pelo apoio fraternal em todas as fases desta pós-graduação, assim como pela amizade acima de qualquer barreira ou dificuldade, e principalmente, por me possibilitar chamá-lo de irmão;

Ao Professor Aristóteles Góes Neto, pela dedicação e zelo fundamental na minha formação;

Ao Secretário Helton Ricardo, pela fidelidade aos princípios de solidariedade;

Aos companheiros do Laboratório LETI, incansáveis trabalhadores;

Aos professores e colegas do curso de mestrado;

Ao novo amigo Dario Assis, pelo empenho e dedicação incondicional;

À Universidade de Feira de Santana especialmente ao Departamento de Biotecnologia pelo acolhimento e funcionalização do meu curso;

À Fundação Gonçalo Muniz por me proporcionar as condições necessárias para pesquisa;

Aos amigos do Hospital Menandro de Farias em especial a Adenilson Amorim e ao amigo Roberto Barroso;

Aos Amigos do Hospital São Rafael, sem os quais não poderia ter realizado este estudo;

Aos meus pacientes que sempre serão o objetivo dos meus esforços para me aprimorar;

Aos animais que respeitosamente utilizei neste estudo.

O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você.

Mário Quintana

De que vale ao homem conquistar todos os tesouros da terra e perder sua alma?

Jesus Cristo

RESUMO

Este estudo aborda a terapia celular pelo transplante autólogo de células-tronco de medula óssea em pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado. Tem por objetivo avaliar a segurança e exequibilidade do transplante de células mononucleares da medula óssea (CMO) em pacientes com doença crônica de fígado em lista de transplante hepático. Dez pacientes (oito masculinos) com doença crônica de fígado foram incluídos no estudo e receberam infusão de células autólogas provenientes da medula óssea. Sete pacientes foram classificados como Child-Pugh B e três como Child-Pugh C. A confecção da linha de base incluiu avaliação clínica e laboratorial completa e ressonância magnética de abdome. Aproximadamente 50 ml aspirado da medula óssea foram preparados com centrifugação em gradiente de Ficoll-hypaque. No mínimo 100 milhões de células mononucleares da medula óssea foram infundidas na artéria hepática usando a técnica rotineira de quimioembolização para tumores hepáticos. Os pacientes foram acompanhados quanto a efeitos adversos por quatro meses. Os resultados indicaram que a média de idade dos pacientes foi de 52 anos (variação entre 24 e 70 anos). Todos os pacientes obtiveram alta com 48 horas após a infusão de células da medula óssea. Dois pacientes se queixaram de dor moderada em sítio de punção da medula óssea. Nenhuma outra complicação ou efeito adverso relacionados ao procedimento foram observados, os níveis de bilirrubina foram menores em um mês (2.19 ± 0.9) e quatro meses (2.10 ± 1.0) após o transplante de células em relação aos níveis de base (2.78 ± 1.2). Os níveis de albumina quatro meses após a infusão de células da medula óssea (3.73 ± 0.5) foram maiores de que os níveis basais (3.47 ± 0.5). Relação de Normalidade Internacional (RNI) decresceu de 1.48 (DP = 0.23) para 1.43 (DP = 0.23) um mês após o transplante celular. Concluiu-se que a infusão de células da medula óssea na artéria hepática de pacientes com doença crônica avançada de fígado é segura e exequível. Adicionalmente, houve um decréscimo na média dos níveis de bilirrubina sérica e RNI e um aumento nos níveis de albumina. Os dados aqui apresentados permitem que outros estudos possam vir a avaliar a eficácia do transplante de células da medula óssea em pacientes com doença crônica de fígado.

Palavras-chave: transplante. medula óssea. células. fígado. doença crônica.

Fortes, Marcos Fraga. **Cellular therapy by Autologus mononuclear bone marrow transplantation in patients with advanced chronic liver disease.** Terapia celular pelo transplante autólogo de células tronco de medula óssea em pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008. 57f. (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia).

Fortes, Marcos Fraga. **Terapia celular pelo transplante autólogo de células mononucleares de medula óssea em pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado.** Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008. 57f. (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia).

ABSTRACT

Addresses cell therapy for transplant autologo of stem cells from bone marrow in patients with parenchymal disease chronic liver. To evaluate the safety and feasibility of bone marrow cell (BMC) transplantation in patients with chronic liver disease on the waiting list for liver transplantation. Ten patients (eight males) with chronic liver disease were enrolled to receive infusion of autologous bone marrow-derived cells. Seven patients were classified as Child-Pugh B and three as Child-Pugh C. Baseline assessment included complete clinical and laboratory evaluation and abdominal MRI. Approximately 50 mL of bone marrow aspirate was prepared by centrifugation in a ficoll-hypaque gradient. At least of 100 millions of mononuclear-enriched BMCs were infused into the hepatic artery using the routine technique for arterial chemoembolization for liver tumors. Patients were followed up for adverse events up to 4 mo. The results of median age of the patients was 52 years (range 24-70 years). All patients were discharged 48 h after BMC infusion. Two patients complained of mild pain at the bone marrow needle puncture site. No other complications or specific side effects related to the procedure were observed. Bilirubin levels were lower at 1 (2.19 ± 0.9) and 4 mo (2.10 ± 1.0) after cell transplantation that baseline levels (2.78 ± 1.2). Albumin levels 4 mo after BMC infusion (3.73 ± 0.5) were higher than baseline levels (3.47 ± 0.5). International normalized ratio (INR) decreased from 1.48 (SD = 0.23) to 1.43 (SD = 0.23) one month after cell transplantation. Concluded that BMC infusion into hepatic artery of patients with advanced chronic liver disease is safe and feasible. In addition, a decrease in mean serum bilirubin and INR levels and an increase in albumin levels are observed. Our data warrant further studies in order to evaluate the effect of BMC transplantation in patients with advanced chronic liver disease.

Key-words: transplant. bone marrow. cells. liver. chronic disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

BMC - TRANSPLANTE DE CÉLULA DA MEDULA

CMN-MO - CÉLULAS MONUNUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

CONEP – COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

CT – CÉLULAS-TRONCO

EPC – CÉLULAS PROGENITIVAS ENDOTELIAIS

MAPCs – MULTIPOTENT ADULT PROGENITOR CELLS

RNI– RELAÇÃO DE NORMALIDADE INTERNACIONAL

SNT – SISTEMA NACIONAL DE TRANSPLANTES

STATA – STACORP STATISTICAL SOFTWARE

VEGF – FATOR ESTIMULADOR DE ENDOTELIO VASCULAR

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Classificação Chil-Pugh..... | 10 |
| Tabela 2 – Lista de espera de transplante de fígado no Brasil 2003-2004..... | 12 |
| Tabela 3 – Transplantes hepáticos realizados no Brasil 2001-2004..... | 13 |
| Tabela 4 – Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e por exames de imagem..... | 19 |
| Tabela 5 – Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e por exames de imagem | 20 |
| Tabela 6 – Características clínicas dos pacientes estudados e número de células de medula óssea autólogas transplantadas..... | 22 |
| Tabela 7 – Distribuição dos níveis de bilirrubinas séricas, albuminas e RNI em dez pacientes com doença hepática crônica, avaliados em linha base um mês e quatro meses após transplante autólogo de células-tronco..... | 23 |
| Tabela 8 – Distribuição dos parâmetros laboratoriais em 10 pacientes com doença hepática crônica em linha de base um mês e quatro meses após transplante de células de medula óssea..... | 27 |
| Figura 1 – Níveis séricos de bilirrubinas..... | 24 |
| Figura 2 – Médias dos níveis séricos de bilirrubinas..... | 26 |
| Figura 3 – Níveis séricos de albumina..... | 28 |
| Figura 4 – Médias dos níveis séricos de albumina..... | 29 |
| Figura 5 – Níveis de RNI..... | 29 |
| Figura 6 – Médias dos níveis séricos de RNI..... | 30 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 2 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 2 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 2 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 2 |
| 3.1 CÉLULAS-TRONCO..... | 2 |
| 3.2 O POTENCIAL REGENERADOR DAS CÉLULAS-TRONCO..... | 3 |
| 3.3 CÉLULAS-TRONCO E FÍGADO..... | 4 |
| 3.4 CÉLULA-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS..... | 8 |
| 3.5 CIRROSE HEPÁTICA E TRANSPLANTE DE FÍGADO | 9 |
| 3.6 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO HEPÁTICO..... | 10 |
| 4 JUSTIFICATIVA | 14 |
| 5 METODOLOGIA..... | 15 |
| 5.1 DESENHO DO ESTUDO..... | 15 |
| 5.2 POPULAÇÃO..... | 15 |
| 5.3 AMOSTRAGEM..... | 15 |
| 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO..... | 16 |
| 5.5 FASE DE SELEÇÃO E DE EXAMES PRÉ-TRANSPLANTE..... | 17 |
| 5.6 FASE DO TRANSPLANTE CELULAR..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 5.7 PROCEDIMENTO DE COLETA E PREPARO DAS CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA | 17 |
| 5.8 AVALIAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS DA TERAPIA..... | 18 |
| 5.9 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA TERAPIA CELULAR | 18 |
| 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 21 |
| 5.11 CENTROS PARTICIPANTES..... | 21 |
| | |
| 6 RESULTADOS..... | 21 |
| | |
| 7 DISCUSSÃO..... | 30 |
| | |
| 8 CONCLUSÃO..... | 36 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 37 |
| | |
| ANEXO A..... | 41 |

1 INTRODUÇÃO

A busca de métodos para o reparo de problemas biológicos causados por lesões, doenças ou pelo envelhecimento tem sido impulsionada pela descoberta de células-tronco (CT), com capacidade de auto-replicação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Como os transplantes heterotópicos de órgãos trazem complicações e limitações, vislumbra-se a possibilidade de se reparar órgãos lesados usando-se terapias celulares.

A pluripotencialidade das CT em tecidos do organismo adulto, como na medula óssea, recoloca a questão da sua utilização terapêutica em bases totalmente novas. Não apenas evitam-se questões ético-religiosas, que cercam a utilização de células embrionárias em pesquisas, as que são obtidas a partir de células da massa interna de embriões na fase de blastocisto, mas, também, são eliminados problemas de rejeição imunológica ao podermos utilizar CT, do próprio paciente, para atuar na regeneração de seus tecidos ou órgãos lesados. Existe, portanto, fundamentada esperança de que a terapia com CT seja um instrumento importante na medicina do futuro.

As CT da medula óssea são obtidas de maneira relativamente fácil e já há experiência, de mais de 30 anos, com a sua manipulação e uso clínico, o que as torna excelentes candidatas para uso terapêutico em medicina regenerativa. As principais CT encontradas na medula óssea são as hematopoiéticas que diferenciam para as linhagens eritróides, mielomonocíticas e linfóides. Como segunda linha, encontram-se as células mesenquimais que dão origem aos tecidos estromais e derivados do mesoderma (KALLIS, 2007). Neste estudo foram investigados a segurança e o potencial terapêutico de células mononucleares de medula óssea autólogas em hepatopatias em estágio avançado.

O transplante ortotópico do fígado é, atualmente, o método de escolha para o tratamento da insuficiência hepática crônica avançada. O tempo de espera nas listas de transplante hepático no Brasil é muito elevado, o que ocasiona um aumento da mortalidade dos pacientes devido à progressão da doença. Portanto, torna-se necessário o estudo de métodos terapêuticos alternativos para a insuficiência hepática avançada que tenham o objetivo de melhorar a sobrevida dos pacientes nas listas de transplante hepático ou até mesmo eliminar a necessidade de transplante do órgão.

A administração de células autólogas mononucleares de medula óssea (CMN-MO) já foi utilizada com segurança para o tratamento de doenças cardíacas em humanos . O benefício desta terapêutica para a re-população de células funcionais vem sendo demonstrado em modelos animais, porém, sua utilização em humanos ainda não está bem definida. A demonstração de segurança da terapia com CMN-MO em pacientes com doença parenquimatosa crônica hepática permitirá a avaliação da sua eficácia, em estudos controlados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a exequibilidade e segurança do transplante autólogo de células mononucleares de medula óssea (CMN-MO) em pacientes com insuficiência hepática crônica avançada com indicação de transplante hepático

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar modificações em testes laboratoriais indicativos de necrose hepatocelular (dosagem sérica das transaminases) e a deterioração da função hepática; (dosagem sérica das bilirrubinas, de albumina e determinação do tempo de protrombina);
- Verificar a potencial eficácia da terapia celular pelo transplante autólogo de células-tronco de medula óssea em pacientes com insuficiência hepática crônica avançada, comparando parâmetros relacionados à função hepática antes e após o tratamento.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÉLULAS-TRONCO

As CT segundo são células não diferenciadas capazes de: proliferar, de fazer auto-renovação da sua população, de produzir um grande número de células derivadas funcionais e diferenciadas e de causar a regeneração tecidual após uma lesão.

As CT podem ser divididas em quatro tipos, de acordo com o potencial de diferenciação: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, ou unipotentes. As células embrionárias são só do tipo totipotentes e geram células de todos os três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma, e ectoderma) formando o futuro órgão. As células pluripotentes contribuem para as três camadas. As CT que se diferenciam em somente uma das camadas germinativas, são consideradas multipotentes e constituem as células-tronco adultas tecido-específicas (DIARMAID et al., 2008).

Desde a década de 60, sabe-se que organismos adultos têm a capacidade de auto-regenerar tecidos, tais como a pele, o epitélio intestinal e o sangue. Durante muitas décadas estudou-se a hematopoiese (processo de produção das células sangüíneas) a partir de CT multipotentes, localizadas na medula óssea, que são capazes de dar origem a células progressivamente mais diferenciadas e com menor capacidade proliferativa. As células mesenquimais da medula óssea, as CT multipotentes, que são as CT melhor caracterizadas em humanos, geram as linhagens progenitoras mielóide e linfóide, que terminam por dar origem a todos os nove tipos celular presentes no sangue .

Atualmente já foram identificadas CT em praticamente todos os tecidos. Mesmo órgãos como o coração e o cérebro, em que se acreditava não ocorrer nenhum processo de regeneração no indivíduo adulto, possuem CT que promovem o reparo tecidual. Alguns tecidos adultos podem servir como fontes de acesso fácil para obtenção de CT, como a medula óssea e o tecido adiposo. No entanto, a maioria das células-tronco de tecidos adultos é de difícil obtenção para o uso clínico rotineiro, e em geral, as células obtidas não podem ser usadas prontamente, pois requerem expansão *in vitro*.

Além do potencial de gerar as células do sistema hematopoiético, foi demonstrada a presença de CT na medula óssea multipotentes, as denominadas células MAPCs (*multipotent adult progenitor cells*) que em condições adequadas poderiam dar origem a células de todos os tecidos do organismo . Portanto, a visão em relação às CT do adulto tem mudado substancialmente nos últimos anos.

3.2 O POTENCIAL REGENERADOR DAS CÉLULAS-TRONCO

A noção de que vários tecidos e órgãos do corpo humano, como o fígado, músculo esquelético, pâncreas e sistema nervoso, têm um estoque de CT com uma capacidade limitada de regeneração tecidual após lesão, é relativamente recente .

Além disso, o clássico paradigma da diferenciação restrita de CT a uma linhagem específica para cada órgão está sendo desafiado pela sugestão de que células-tronco adultas, incluindo CT hematopoiéticas, possuem um grau previamente desconhecido de desenvolvimento de plasticidade que permite a elas se diferenciarem em outros tecidos .

O primeiro relato desta propriedade das CT de medula óssea adultas foi feito em 1998, por um grupo de cientistas italianos, que estudaram a regeneração de músculo esquelético por células derivadas da medula óssea. Quando, ao invés de injetar as células medulares na lesão muscular, os autores realizaram um transplante da medula óssea geneticamente marcada, entre camundongos, observaram a migração de células medulares geneticamente marcadas para a área lesada no músculo esquelético do receptor, sugerindo que, sob condições de agressão tecidual, CT medulares adultas podem migrar para a região lesada e se diferenciar em músculo esquelético .

Avaliações de tecidos obtidos de indivíduos transplantados com células ou órgãos de indivíduos de sexo oposto corroboraram a noção de que células da medula óssea podem se diferenciar em células de outros tecidos. Esses estudos, de quimerismo em pacientes, demonstraram a presença de células do doador, que foram positivas para o cromossomo Y em diferentes órgãos após transplante de medula óssea de indivíduo masculino para feminino).

Os mecanismos pelos quais as células-tronco circulantes são recrutadas para órgãos ou tecidos específicos ainda não são completamente compreendidos. A lesão tecidual causa mudanças regionais que podem exercer um papel importante no recrutamento das CT .

3.3 CÉLULAS-TRONCO E FÍGADO

Algumas doenças hepáticas de diversas etiologias afetam, primariamente, os hepatócitos e podem levar à disfunção da célula hepática e insuficiência do órgão. Em um fígado normal

após a ressecção de 75% da massa hepática, a depender do organismo, em uma semana o mesmo retorna ao número original de células e em duas a três semanas recupera a massa tecidual original. A regeneração hepática é um fenômeno de reestruturação de células endógenas e deve ser diferenciada das reconstituições por células transplantadas de doadores, que consiste na repopulação do fígado por novas células.

O parênquima hepático é composto principalmente de hepatócitos e colangiócitos, mas diferentemente de outros órgãos do trato gastrointestinal, a massa hepática é restaurada em sua maioria pela divisão de hepatócitos adultos e não pelas CT (KALLIS, 2007). Porém, as células medulares, podem ser fonte para reparo de vários tipos de células epiteliais hepáticas, principalmente, na vigência de insuficiência aguda ou crônica. Os mecanismos relacionados à aparente diferenciação das células-tronco para hepatócitos novos e maduros têm sido amplamente debatidos. Inicialmente, algumas observações sugeriram, em modelo experimental, que a trans-diferenciação poderia explicar a conversão das células-tronco da medula óssea em hepatócitos.

Autores como demonstraram em seus estudos que, ao invés da trans-diferenciação, a fusão das células-tronco com as células hepáticas era o principal mecanismo responsável pela regeneração dos hepatócitos.

Mais importante que a definição da existência de diferenciação ou fusão de células-tronco com hepatócitos é avaliar a persistência e efeitos destes fenômenos. Os prováveis efeitos paracrinos podem influenciar o potencial de replicação dos hepatócitos, modular o grau de fibrogenese, potencializar o processo de degradação da fibrose e atuar sobre a angiogenese (DIARMAID, 2008).

Uma possível explicação para a estreita relação entre o fígado e a medula óssea é a possibilidade da existência de progenitores hepáticos dentro da medula óssea. Estas células estariam em estado quiescente e poderiam ser ativadas em resposta à lesão do hepatócito (KALLIS, 2007).

Apesar das evidências de que CT hematopoiéticas são importantes fontes de hepatócitos ou células progenitoras hepáticas (ROSKAM et al., 2004), outras células derivadas da medula óssea são provavelmente essenciais nas respostas às lesões hepáticas. Células, como macrófagos, podem produzir mediadores essenciais à restauração dos danos teciduais e junto

com as células de Kupffer podem fagocitar células mortas durante o remodelamento do tecido. A infusão de CT diretamente no fígado pode ser fonte de uma série de reações que proporcionariam uma melhor reestruturação hepática após uma lesão .

O conhecimento da fusão entre hepatócitos do receptor e CT do doador, gerando uma estrutura funcional, criou uma nova linha de pesquisa que consiste na descoberta de substâncias que induzam este fenômeno que, embora conhecido e existente, é raro. Os hepatócitos podem ser gerados diretamente pela diferenciação de CT de medula óssea ou indiretamente intermediado por células ovais. Existe consistente controvérsia, principalmente, quando comparados estudos em humanos e estudos experimentais em roedores. Em animais ainda não foi estabelecido que o transplante de medula óssea deva ser considerado como opção terapêutica para doenças hepáticas ; KALLIS, 2007).

) transplantaram CT de medula óssea de ratos machos marcadas geneticamente (antígenos CD26 ou L-21-6) em fêmeas letalmente irradiadas e as submeteram à agressão hepática severa, observando a presença de hepatócitos provenientes do doador no fígado dos animais receptores. em estudo semelhante feito em camundongos, observou a presença de hepatócitos positivos para cromossomo Y e expressão de albumina em receptores de CT de medula óssea.

estudando a capacidade de diferenciação de CT de medula óssea em hepatócitos, transplantou CT hematopoiéticas purificadas ($c\text{-Kit}^+$ Thy^{low} Lin^- Sca-1^+) em camundongos FAH^{-/-}(Fumaril Acetoacetato Hidroxilase) letalmente irradiados e submetidos à agressão hepática. Sete meses após o transplante, foram observados numerosos nódulos de repopulação de hepatócitos FAH positivos, correspondendo a um percentual de 30 a 50% da repopulação hepática. Estudo realizado por utilizando marcadores Bcl-2 demonstrou em camundongos somente de 0,05 a 0,8% de repopulação hepática.

isolaram CT hepáticas derivadas da medula óssea de ratos com colestase, que, ao serem transplantadas através da veia porta de fígados receptores, levaram ao surgimento de hepatócitos maduros que apresentaram, em cultura, um fenótipo funcional, com capacidade de metabolizar amônia para uréia.

As lesões crônicas de fígado são normalmente acompanhadas de fibrose, devido à inflamação e conseqüente ativação de células estreladas hepáticas, proliferando e sintetizando colágeno.

Existem evidências de que parte da população de miofibroblastos possam ser derivados de células da medula óssea, em modelo experimental com lesão de fígado por tetracloreto de carbono (CCl₄) e tioacetamida, mais de 70% das células estreladas hepáticas e miofibroblastos envolvidas nas fibroses septais foram derivadas da medula óssea (RUSSO et al., 2006).

Os autores informam ainda que as células mesenquimais são as prováveis principais precursoras do miofibroblasto, contudo, outras células da medula óssea podem estar envolvidas, dentre elas as CT hematopoiéticas, podendo promover não somente a regeneração hepática, como também atenuar os processos fibróticos.

Em estudo realizado com receptores do sexo masculino de fígado de doadores do sexo feminino, com recidiva de doença hepática, 6 a 22% da fibrose hepática tinham miofibroblasto cromossomo Y positivo, sugerindo papel relevante das células derivadas da medula óssea no reparo destes pacientes (FORBES et al., 2004).

Estudos em modelos animais com doença hepática têm demonstrado que o transplante de células da medula óssea pode reduzir o grau de fibrose hepática e ter impacto na sobrevida. Sakaida et al., (2005) investigaram o efeito do transplante de células da medula óssea em camundongos com fibrose estabelecida em fígado induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Quatro semanas após o transplante, os camundongos apresentaram significativa redução da fibrose comparado com os camundongos com somente CCl₄. Estudos com CT mesenquimais corroboram com estes dados, com redução de fibrose e aumento na expressão de albumina (OYAGI et al., 2006).

Resultados encorajadores têm sido obtidos também em estudos com seres humanos. estudando mulheres submetidas a transplante de medula a partir de doador masculino, assim como em transplantes de fígado de doadoras mulheres para receptores homens, observaram o aparecimento de hepatócitos positivos para cromossomo Y. Este estudo foi corroborado por outros autores como, Theise) que demonstraram a presença de células derivadas da medula óssea transplantada em todo o trato gastrointestinal biopsiado.

Estudos recentes substanciam a existência de CT que têm potencial para gerar células de linhagens diversas como hepatócitos e epitélio biliar, porém a origem destas células permanece

uma controvérsia, assim como o método adequado para a análise funcional e propriedades destas .

Pesquisadores do Imperial College, da University College de Londres e do Fundo Imperial para Pesquisa de Câncer afirmaram que as CT podem ser facilmente coletadas de um paciente e estimuladas a se desenvolverem em células hepáticas, através da manipulação de seu meio, tornando esta informação pública e estimulando a comunidade científica a elucidar estas questões .

Em 1996, Goodell et al., isolaram uma população de CT hematopoiéticas do fígado de camundongos com atividade excludente de Hoechst (*side population*). Estas células se diferenciaram *in vitro* em hepatócitos e *in vivo* em hepatócitos e células epiteliais do ducto biliar. Outras populações de CT no fígado, como as mesenquimais, precursores localizados no espaço periductular com origem provável na medula óssea e células indiferenciadas localizadas no canal de Hering, podem contribuir para a geração de células ovais e regeneração hepática (CHIBA et al., 2006).

3.4 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

A medula óssea contém uma grande variedade de tipos celulares, incluindo CT e precursores capazes de regenerar continuamente as células sanguíneas. Há mais de 40 anos as CT hematopoiéticas são utilizadas na prática médica para fins hematológicos e oncológicos, e por isso o conhecimento sobre estas é mais amplo do que para outros tipos de células-tronco.

O potencial de diferenciação das CT hematopoiéticas em tipos celulares não hematopoiéticos é um tema bastante discutido. A discordância se dá ainda porque em muitos trabalhos utilizam-se populações celulares denominadas de CT hematopoiéticas e são utilizadas, na realidade, células da medula óssea que contêm, em maior ou menor proporção, populações diferentes de CT, incluindo o que se chama de mesenquimal (ou estromal) (KALLIS et al., 2007).

CT hematopoiéticas circulam em condições normais ou patológicas e podem participar de processos de neovascularização. As CT hematopoiéticas expressam geralmente CD34 na sua superfície, que é também um marcador de células endoteliais e seus progenitores. As chamadas células progenitoras endoteliais (EPC) são células provenientes da medula óssea encontradas

na circulação e que podem migrar para áreas de isquemia e participar da formação de novos vasos sanguíneos. Estas células foram obtidas *in vitro* a partir de culturas de CT hematopoiéticas, e são caracterizadas pela expressão de receptor 2, do fator estimulador de endotélio vascular (VEGF), de fator Von Willebrand e de sintetase de óxido nítrico endotelial (eNOS) ([AICHER](#) et al., 2005).

3.5 CIRROSE HEPÁTICA E TRANSPLANTE DE FÍGADO

A cirrose hepática está associada a diferentes etiologias e corresponde anatomicamente a um processo difuso de fibrose com formação de nódulos. As manifestações clínicas são diversas, refletindo em parte um grande número de processos fisiopatológicos que podem lesar o fígado e sua grande capacidade de reserva. Estima-se que aproximadamente, 40% dos pacientes com cirrose são assintomáticos. Uma vez sintomático, o estado geral do paciente é debilitado com repercussões negativas na sua vida cotidiana, muitas vezes incapacitando-o para o trabalho, além de representar elevados custos financeiros.

A cirrose contabiliza cerca de 26.000 mortes por ano nos EUA, e mais de 228.145 anos potenciais de vida perdidos. O paciente com cirrose alcoólica perde em média 12 anos de vida produtiva, muito mais do que pacientes com cardiopatia (dois anos) e câncer (quatro anos), o que enfatiza a necessidade de um diagnóstico precoce.

Não há dúvida de que o vírus da hepatite C (VHC) constitui atualmente o principal agente etiológico de doença hepática avançada. De acordo com a região geográfica estudada, entre 30 e 75% dos casos de cirrose estão relacionados ao VHC. O quadro clínico evolutivo é caracterizado por formas assintomáticas na maioria dos pacientes, porém uma menor proporção desenvolve hepatite crônica, hipertensão portal e cirrose, notadamente, quando há associação com co-morbidades como o álcool, vírus B e vírus HIV.

Na presença de cirrose, o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, nos EUA, é observado em 4% dos casos ao ano. Na maioria das regiões geográficas, a cirrose por vírus C é a principal causa de transplante hepático em adultos. O desenvolvimento de carcinoma hepatocelular é uma causa de descompensação hepática e tem indicação para transplante hepático quando a dimensão do tumor for inferior a 5 cm, nódulo único, ou menor do que 3 cm até três nódulos.

3.6 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO HEPÁTICO

A indicação para o transplante hepático nos pacientes com cirrose ocorre na fase de descompensação da doença. Nesta situação a reserva funcional hepática está comprometida, culminando em um quadro clínico de insuficiência hepática, aparecimento de edemas, ascite, icterícia, atrofia da musculatura, encefalopatia hepática e alterações laboratoriais: hipoalbuminemia < 3g/dl; prolongamento do tempo de protrombina (abaixo de 50% do controle). Nessa condição a mortalidade é elevada nos primeiros dois anos, muitas vezes não havendo tempo hábil para esperar por tratamento adequado como o transplante hepático. A gravidade da doença hepática é universalmente avaliada pela classificação de Child-Pugh (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação Child-Pugh

| Encefalopatia | (-) | I-II | III-IV |
|---------------|--------------|-----------------|-------------|
| Ascite | (-) | Leve a moderada | Tensa |
| Bilirrubinas | <2 mg/dl | 2-3 mg/dl | >3.0 mg/dl |
| Albumina | >3,5 g/dl | 3,5-3,0 g/dl | <3,0 g/dl |
| Protrombina | >80% | 80-60% | <60% |
| | < 4 segundos | 4-6 segundos | >6 segundos |
| Pontos | 1 | 2 | 3 |

Pontuação – A:5-6 B:7-9 C>9

Atualmente o transplante hepático oferece sobrevida de 75 a 80% em três anos dos pacientes transplantados. Entre 2001 a 2004 foram realizados, no Brasil, 2697 transplantes hepáticos, porém, em 2003, a lista de espera era de 4287 pacientes. Em 2004 a lista de espera cresceu para 6107 pacientes. Estes dados mostram a necessidade de uma política bem orientada para aumentar o número de doações e reduzir a frequência de óbito em listas de espera para o transplante hepático. A proporção de doações de fígado de cadáveres é bem menor do que a proporção de pacientes que são incluídos, a cada ano, na lista de receptores para o transplante (Tabelas, 2 e 3).

Como consequência desta desigualdade, observa-se um aumento progressivo de pacientes com insuficiência hepática grave nas listas de espera para o transplante, deixando o desalentador registro do aumento de óbitos por falta de doação de órgão. Na Bahia foram realizados entre 2001 e 2003, 18 transplantes hepáticos e, em 2004, somente 12 transplantes, contrapondo-se a uma lista de 87 candidatos, comparados a 59 pacientes no ano de 2003.

Está bem estabelecida a eficácia do transplante ortotópico de fígado como opção terapêutica para pacientes com doença hepática avançada. Entretanto, um grande número destes pacientes

não consegue sobreviver ao longo período de espera nas listas. Torna-se necessário e urgente, portanto, a realização de melhores programas de captação de órgãos, ou alternativas terapêuticas que atenuem o grau de disfunção hepática e contribuam para aumentar o tempo de sobrevivência dos pacientes em listas para a realização do transplante.

A possibilidade de tratamento com células mononucleares autólogas poderá vir a representar uma importante etapa na conquista do objetivo de aumentar a sobrevivência destes pacientes e permitir a realização da cirurgia. Em pacientes com cardiopatias à espera de um transplante cardíaco, o tratamento com CT já vem sendo realizado e os resultados são promissores em otimizar a função cardíaca. O impacto das terapias alternativas que possam vir a prorrogar ou evitar os transplantes de órgãos é de grande relevância, já que estes procedimentos são de alto risco, com grande custo, envolvem políticas complicadas de doações de órgãos, necessita de equipes com formação específica, logística hospitalar de alta complexidade e geram uma condição clínica para o paciente de difícil controle com uso de imunossuppressores indefinidamente e drogas de resgate de rejeição, com conseqüentes implicações no sistema de saúde pública e na condição social e laborativa do indivíduo.

Tabela 2 - Lista de Espera de Transplante de Fígado, no Brasil, em 2003 – 2004.

| | 2003 | | 2004 |
|---------------------|--------|---------------------|--------|
| ESTADOS | FÍGADO | ESTADOS | FÍGADO |
| Alagoas | - | Alagoas | - |
| Amazonas | - | Amazonas | - |
| Bahia | 59 | Bahia | 87 |
| Ceará | 37 | Ceará | 98 |
| Distrito Federal | 4 | Distrito Federal | 2 |
| Espírito Santo | - | Espírito Santo | - |
| Goiás | - | Goiás | - |
| Maranhão | - | Maranhão | - |
| Mato Grosso | - | Mato Grosso | - |
| Mato Grosso do Sul | - | Mato Grosso do Sul | - |
| Minas Gerais | 141 | Minas Gerais | 154 |
| Pará | - | Pará | - |
| Paraíba | - | Paraíba | 6 |
| Paraná | 406 | Paraná | 436 |
| Pernambuco | 268 | Pernambuco | 351 |
| Piauí | - | Piauí | - |
| Rio de Janeiro | 556 | Rio de Janeiro | 1,093 |
| Rio Grande do Norte | - | Rio Grande do Norte | - |
| Rio Grande do Sul | 246 | Rio Grande do Sul | 372 |
| Santa Catarina | 8 | Santa Catarina | 21 |
| São Paulo | 2562 | São Paulo | 3,487 |
| Sergipe | - | Sergipe | - |
| Total | 4287 | TOTAL | 6,107 |

Fonte: Dados obtidos do Sistema Nacional de Transplante.

Tabela 3 - Transplantes hepáticos realizados no Brasil de 2001 a 2004.

| | 2004 | 2004 | 2003 | 2003 | 2002 | 2002 | 2001 | 2001 |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | DV | DC | DV | DC | DV | DC | DV | DC |
| Alagoas | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Amazonas | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bahia | - | 12 | - | 3 | - | 2 | 1 | - |
| Ceará | - | 35 | - | 28 | - | 3 | - | 2 |
| Distrito Federal | - | - | - | - | - | - | - | 4 |
| Espírito Santo | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Goiás | - | 2 | - | - | - | - | - | - |
| Maranhão | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mato Grosso | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Mato Grosso do Sul | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Minas Gerais | 1 | 46 | - | 51 | - | 36 | - | 54 |
| Pará | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Paraíba | - | 5 | - | - | - | - | - | - |
| Paraná | 42 | 23 | 51 | 32 | 41 | 46 | 33 | 38 |
| Pernambuco | 8 | 28 | 2 | 43 | 1 | 21 | - | 15 |
| Piauí | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rio de Janeiro | 14 | 59 | 7 | 62 | 1 | 60 | 1 | 30 |
| Rio Grande do Sul | 4 | 78 | 8 | 119 | 7 | 103 | 1 | 93 |
| Rio Grande do Norte | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Santa Catarina | - | 12 | - | 10 | - | 6 | - | - |
| São Paulo | 67 | 275 | 84 | 291 | 79 | 241 | 39 | 239 |
| Sergipe | - | - | - | - | - | 0 | - | - |
| Total | 135 | 575 | 152 | 639 | 129 | 518 | 74 | 475 |

DC-doador cadáver; DV-doador vivo

Fonte: Dados obtidos do Sistema Nacional de Transplante

4 JUSTIFICATIVA

A doença crônica de fígado pode evoluir para fase terminal de doença, falência hepática e morte dos pacientes. Nas fases avançadas de doença, estes podem apresentar complicações como encefalopatia, ascite, hemorragia por varizes esofagianas. O transplante hepático ainda é o tratamento adequado para estes pacientes. Em centros de países desenvolvidos, 10 a 15% dos pacientes em lista de transplante falecem sem serem submetidos ao transplante. Em alguns centros de países em desenvolvimento estes números podem ser ainda maiores. Portanto, métodos alternativos como a utilização de CT, são necessários para aumentar a sobrevida dos pacientes em lista de transplante.

A literatura específica informa que estudos em modelos animais têm demonstrado que o transplante de células da medula óssea pode acelerar o processo de regeneração hepática, reduzir a fibrose do fígado, melhorar a função do órgão e sobrevida. Com base em outros estudos clínicos que demonstraram a potencial segurança das células de medula óssea e sua potencial eficácia no tratamento de lesões cardíacas, assim como nos dados experimentais em modelos de doenças hepáticas, a investigação clínica do potencial terapêutico de células de medula óssea em pacientes com doenças hepáticas é de grande interesse.

As condições de transplantes ortotópicos de fígado, que permanece ainda hoje como o tratamento de escolha para pacientes com doença crônica de fígado descompensada, variam significativamente de acordo com as características geográficas, sociais e econômicas e culturais de cada Unidade Federativa podendo ser desde insuficientes ou até mesmo inexistentes. Contudo, para o paciente que perde o tempo hábil para ser transplantado, significa sucumbir à história natural da doença.

Novas alternativas são fundamentais para mudanças deste cenário. As características de replicação e plasticidade das células-tronco, permitindo diferenciação em tipos específicos de células uma vez devidamente estimuladas, nos permite vislumbrar meios alternativos de suporte para que os pacientes tenham melhores sobrevidas nas listas de transplantes e até mesmo se tornarem importantes métodos terapêuticos.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO

O estudo está fundamentado no ensaio terapêutico de fase I

5.2 POPULAÇÃO

Foram estudados dez pacientes com insuficiência hepática crônica avançada, pertencentes à classificação de Child-Pugh B ou C. Esses indivíduos foram selecionados a partir do ambulatório de transplante hepático do Hospital São Rafael e do ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

5.3 AMOSTRAGEM

O estudo contou com dez pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado, locados em lista de transplante hepático, oito do sexo masculino e dois do sexo feminino, a idade variou entre 24 e 70 anos. Estes receberam infusão autóloga de células da medula óssea, durante o período de setembro de 2005 a Janeiro de 2006. Todos concordaram e assinaram um consentimento informado (Anexo A). O estudo obedeceu às diretrizes éticas conforme a Declaração de Helsinki de 1975 e também foi aprovado pela Comissão de ética do Hospital São Rafael, Salvador, Bahia e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Foram incluídos os pacientes que preencheram os seguintes critérios: idade entre 18-75 anos, portadores de doença crônica parenquimatosa de fígado de diferentes etiologias classificadas como Child-Pugh B e C, ausência de tumor no fígado e uso apropriado de anticoncepcionais em mulheres em idade fértil.

O estudo de inclusão constou de avaliação clínica e laboratorial completa assim como ressonância magnética de abdome total para exclusão de tumores hepáticos. Os exames laboratoriais consistiram em hemograma completo, bilirrubinas séricas, tempo de protrombina, glicemia, uréia, creatinina, alfafetoproteína, proteínas totais e albumina, concentração sérica de aminotransferases, fosfatase alcalina, níveis de gama-glutamil transferases e concentração do hormônio estimulante da tireóide. Os pacientes foram seguidos com avaliação de efeitos adversos através de avaliações clínicas e laboratoriais nos dias 1, 2, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 após o transplante de células da medula óssea.

Aproximadamente 50 ml da medula óssea foram aspirados através da crista ilíaca. Uma fração enriquecida de células mononucleares provenientes da medula óssea foi obtida por centrifugação em gradiente de ficoll-hypaque. Pelo menos 100 milhões de células mononucleares resultantes deste processo foram diluídas em salina para infusão via artéria hepática através de cateter usando técnica semelhante à utilizada para quimioembolização de tumores hepáticos.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO

| Inclusão | Exclusão |
|--|---|
| Idade entre 18 e 75 anos | Impossibilidade em obter acesso vascular para procedimento percutâneo |
| 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 | Sepsis (definida de acordo com os critérios da Society of Critical Care Medicine e American College of Chest Physicians, 1992); |
| A seleção dos pacientes obedeceu à ordem decrescente a partir da última colocação na lista de transplante | Vigência de encefalopatia hepática; |
| | Vigência de coagulopatia grave com RNI >2,0 ou plaquetopenia <40.000; |
| Pacientes com alta probabilidade de serem submetidos ao transplante hepático não foram incluídos no estudo. Admitiu-se, na lista de transplante do Hospital S. Rafael, como alta probabilidade de serem chamados para a cirurgia, os 2 próximos pacientes do grupo sanguíneo A, os 2 próximos do grupo sanguíneo O, bem como os primeiros dos grupos B e AB. | Neoplasias malignas (exceto câncer de pele não melanoma); |
| | Insuficiência cardíaca descompensada; |
| Ausência de evidências clínicas, laboratoriais ou radiológicas de carcinoma hepatocelular | Doenças hematológicas primárias; |
| | Insuficiência renal moderada (creatinina acima de 2 mg/dl); |
| Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido | Dependência de suporte orgânico, como circulatório ou ventilatório |
| | Gravidez; |
| | Participação em outro ensaio clínico. |

5.5 FASE DE SELEÇÃO E DE EXAMES PRÉ-TRANSPLANTE

Todos os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica, com obtenção da anamnese e exame físico, a uma avaliação laboratorial com a determinação da classificação de Child-Pugh, hemograma completo, proteínas totais e albumina, bilirrubinas, tempo de protrombina, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, sódio, potássio, uréia, creatinina, como também, a exames de imagem incluindo ressonância magnética de abdome superior. Um eletrocardiograma foi realizado em todos os indivíduos à admissão. Foram considerados válidos os exames laboratoriais dos últimos 30 dias e exames de imagem dos últimos três meses.

5.6 FASE DO TRANSPLANTE CELULAR

Todos os pacientes foram submetidos à terapia celular após admissão hospitalar. Um mínimo de 50 milhões de células mononucleares, da medula óssea (obtidas a partir de 50 ml de sangue de medula óssea, coletados por punção da crista ilíaca) foi injetado na artéria hepática em solução salina albuminada a 5%, no mesmo dia do isolamento das células, através de cateter, após arteriografia, utilizando técnica semelhante à de quimioembolização arterial para carcinoma hepatocelular. O volume de infusão foi de aproximadamente 20 ml, em infusão contínua, durante 10 minutos.

5.7 PROCEDIMENTOS DE COLETA E PREPARO DAS CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA

Os pacientes foram posicionados individualmente em decúbito ventral; cada paciente foi sedado com propofol I.V. e receberam anestesia local pela administração de 10 ml de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor, distribuindo-se 5 ml para cada crista ilíaca de modo a anestesiarem as áreas no perióstio a serem puncionadas, e não um único ponto. Foram utilizadas agulhas de Osgood para punções medulares, em número de 10 (5 em cada crista ilíaca), sempre em pontos distintos da crista ilíaca. Foram retirados 5 ml de medula óssea em cada aspirado, utilizando seringas de 20 ml, previamente preenchidas com 0,2 ml de heparina (1000 unidades).

Aproximadamente 50 ml de medula óssea foram diluídos 1:1 com solução salina e utilizados para a separação da fração de células mononucleares por centrifugação em gradiente de Ficoll-

Hypaque. O anel de células mononucleares acima da camada de Ficoll foi coletado e centrifugado repetidamente em RPMI e soro fisiológico albuminado a 5%. Após contagem das células (em câmara de Neubauer com Turk e azul de Trypan objetivando estimar a viabilidade celular) foi ajustada a suspensão celular, para um volume final de 20 ml e colocada em uma seringa estéril de 20 ml, para encaminhamento para o centro de hemodinâmica.

5.8 AVALIAÇÃO DOS EVENTOS ADVERSOS DA TERAPIA

Foi considerado evento adverso relacionado à terapia os efeitos colaterais observados no período de 30 dias após a infusão das células mononucleares. Foi considerado agravamento da função hepática um aumento de dois pontos no escore da classificação de Child-Pugh. Alterações inflamatórias sistêmicas relacionadas à administração de CMN-MO na circulação hepática foram caracterizadas pela presença de taquicardia, febre ou leucocitose.

5.9 AVALIAÇÕES DA EFICÁCIA DA TERAPIA CELULAR

Foi considerada melhora clinicamente significativa da função hepática, uma diminuição em dois pontos na classificação de Child-Pugh. Esses critérios foram adotados em outros trabalhos apontados na literatura específica (MOHAMADNEJAD et al., 2007)

As avaliações dos dados laboratoriais, principalmente nível sérico de albumina e tempo de protrombina, refletem o grau de reserva e função hepática, antes e após transplante de CT.

Tabela 4 - Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e por exames de imagem.

| PROCEDIMENTO | TRIAGEM | INTERNAMENTO HOSPITALAR | | | | ACOMPANHAMENTO AMBULATORIAL | | |
|----------------------------------|---------|--------------------------------|-------|---------------|--|-----------------------------|--------|--------|
| | | DIA 1 TRANSPLANTE CMN-MO | DIA 2 | DIA 3 ALTA | | DIA 7 | DIA 14 | DIA 30 |
| ANAMNESE E EXAME FÍSICO | X | X | X | X | | X | X | X |
| HEMOGRAMA | X | X | X | X | | X | X | X |
| PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES | X | X | X | X | | X | X | X |
| BILIRRUBINAS | X | X | X | X | | X | X | X |
| TEMPO DE PROTROMBINA | X | X | X | X | | X | X | X |
| TTPA | X | X | X | X | | X | X | X |
| AST | X | X | X | X | | X | X | X |
| ALT | X | X | X | X | | X | X | X |
| FOSFATASE ALCALINA | X | X | X | X | | X | X | X |
| GAMA GT | X | X | X | X | | X | X | X |
| αFETO-PROTEÍNA | X | | | | | | | |
| FERRITINA | X | | | | | | | |
| SAT TRANSFERRINA | X | | | | | | | |
| SÓDIO | X | X | X | X | | X | X | X |
| POTÁSSIO | X | X | X | X | | X | X | X |
| URÉIA | X | X | X | X | | X | X | X |
| CREATININA | X | X | X | X | | X | X | X |
| GLICOSE | X | X | X | X | | X | X | X |
| T4 LIVRE | X | | | | | | | |
| TSH | X | | | | | | | |
| COLESTEROL | X | | | | | | | |
| TRIGLICÉRIDES | X | | | | | | | |
| US DE ABDOME COM DOPPLER | X | | | | | | | |
| TC DE ABDOME/RMI | X | | | | | | | |

Tabela 5 - Protocolo de acompanhamento clínico, laboratorial e por exames de imagem.

| PROCEDIMENTO | DIA 45 | DIA 60 | DIA 90 | DIA 120 | DIA 150 | DIA 180 | DIA 240 | DIA 300 | DIA 360 |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ANAMNESE E EXAME FÍSICO | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| HEMOGRAMA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| PROTEÍNAS TOTAIS E FRAÇÕES | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| BILIRRUBINAS | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| TEMPO DE PROTROMBINA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| TTPA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| AST | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| ALT | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| FOSFATASE ALCALINA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| GAMA GT | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| α FETO-PROTEÍNA | | X | | X | | | X | | X |
| FERRITINA | | X | | X | | | X | | X |
| SAURAÇÃO DE TRANSFEERRINA | | X | | X | | | X | | X |
| SÓDIO | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| POTÁSSIO | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| URÉIA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| CREATININA | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| GLICOSE | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| T4 LIVRE | | | X | | | X | | | X |
| TSH | | | X | | | X | | | X |
| COLESTEROL | | | X | | | X | | | X |
| TRIGLICÉRIDES | | | X | | | X | | | X |
| US DE ABDOME COM DOPPLER | | | X | | | X | | | X |
| TC DE ABDOME / RMI | | | | | | X | | | X |

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise das medidas foi realizada com cálculos de médias, desvios padrões e intervalo de confiança de 95% (testes laboratoriais e escore de Child-Pugh, tomando para linha de base os meses um e quatro). As modificações dos riscos relativos entre o primeiro e o quarto mês foram calculadas. Para estudo da evolução dos parâmetros laboratoriais, após infusão de células da medula óssea as respostas foram registradas, individualmente, conforme tempo preestabelecido. Adicionalmente, a estimativa das médias obtidas e de 95% de intervalo de confiança foram obtidas pelo cálculo das variações médias dos pacientes registradas sobre um período acima de quatro semanas, e por aplicação de interpolação linear. Toda a análise estatística foi conduzida pelo programa STATA (Stata Corp. 2005. Stata Statistical Software: Release 8. College Station, TX: Stata Corp LP).

5.11 CENTROS PARTICIPANTES

O protocolo foi desenvolvido no Hospital São Rafael / Fundação Monte Tabor-Salvador-Bahia, em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz e com o Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

6 RESULTADOS

Foram avaliados dez pacientes com média de idade de 52 anos (variando entre 24 e 70 anos). Oito do sexo masculino e dois do feminino, três pacientes com doença crônica alcoólica de fígado; três com hepatite crônica tipo C; dois com associação entre vírus C e alcoolismo; um com doença colestática de fígado e um com cirrose criptogênica (Tabela 6). Quanto à classificação de Child-Pugh sete foram classificados como B e três como C, não houve pacientes classificados como A.

Foram realizadas coletas de sangue por punção de medula óssea da crista ilíaca sob anestesia local e sedação em pacientes cirróticos e com baixos índices de complicações. A via de acesso à artéria hepática foi por punção e cateterismo da artéria femoral em todos os casos, também sem complicações relatadas.

Diferenças ocorreram quanto ao número de células mononucleares provenientes da medula e isoladas em gradiente de ficoll-hypaque para cada paciente e infundidas em artéria hepática, como pode-se observar na tabela 6, demonstrando que em paciente de 70 anos e cirrose alcoólica, houve a menor celularidade, e em paciente de 24 anos com cirrose colestática, houve a maior celularidade, não se realizou prévia estratificação quanto aos tipos de causas de doença hepática crônica.

Todos os pacientes evoluíram sem intercorrência e obtiveram alta no terceiro dia de internamento, após procedimento de infusão de células mononucleares, completando o tempo de avaliação inicial conforme protocolo estabelecido e coleta de dados.

Não houve complicações importantes descritas, somente dor leve em sítio de punções em dois pacientes.

Tabela 6 - Características clínica dos pacientes estudados e número de células da medula óssea autólogas transplantadas

| Paciente Identificação | Idade(anos) | Sexo | Etiologia da cirrose | Número de células transplantadas |
|-----------------------------------|--------------------|-------------|-----------------------------|---|
| JWOR | 49 | MASCULINO | ÁLCOOL+HCV | 2.8×10^8 |
| FMB | 60 | MASCULINO | ÁLCOOL | 5.2×10^8 |
| EAS | 63 | FEMININO | HCV | 3.2×10^8 |
| RNR | 24 | MASCULINO | COLESTASE | $13,1 \times 10^8$ |
| IAN | 49 | MASCULINO | ÁLCOOL+HCV | 2.6×10^8 |
| NPA | 55 | FEMININO | CRIOGÊNICA | 3.5×10^8 |
| RBC | 49 | MASCULINO | ÁLCOOL | 4.8×10^8 |
| RMV | 66 | MASCULINO | HCV | 3.4×10^8 |
| GAFL | 70 | MASCULINO | ÁLCOOL | 1.6×10^8 |
| ABSF | 40 | MASCULINO | HCV | 2.4×10^8 |

Tabela 7- Distribuição dos níveis de bilirrubinas séricas, albuminas e RNI em dez pacientes com doença hepática crônica avaliados em linha de base, um mês e quatro meses após transplante autólogo de células-tronco da medula óssea.

| | Mínimo | Máximo | Média | Mediana | Desvio padrão | Varição relativa da média a partir da linha de base (%) |
|----------------------|--------|--------|-------|---------|---------------|---|
| Bilirrubinas (mg/dl) | | | | | | |
| Valores basais | 1.2 | 4.83 | 2.78 | 2.45 | 1.16 | |
| 01 mês | 0.5 | 3.56 | 2.19 | 2.28 | 0.91 | -21 |
| 04 meses | 0.72 | 4.16 | 2.1 | 1.87 | 1.04 | -24 |
| Albumina | | | | | | |
| Valores basais | 2.5 | 4.4 | 3.47 | 3.5 | 0.51 | |
| 01 mês | 2.9 | 4.5 | 3.44 | 3.25 | 0.52 | -1 |
| 04 meses | 3.1 | 4.8 | 3.73 | 3.6 | 0.51 | 7 |
| RNI | | | | | | |
| Valores basais | 1.08 | 1.89 | 1.46 | 1.48 | 0.23 | |
| 01 mês | 1.1 | 1.94 | 1.44 | 1.43 | 0.23 | -1 |
| 04 meses | 1.16 | 1.75 | 1.42 | 1.43 | 0.18 | -3 |

Um paciente de 70 anos, com história prévia de encefalopatia hepática, desenvolveu episódio reversível de encefalopatia hepática grau 1, trinta e três dias após infusão das células da medula óssea. Este episódio foi controlado sem necessidade de hospitalização e não foi considerado como efeito adverso desde que, três episódios idênticos, foram documentados neste paciente no último ano anteriormente à inclusão no estudo.

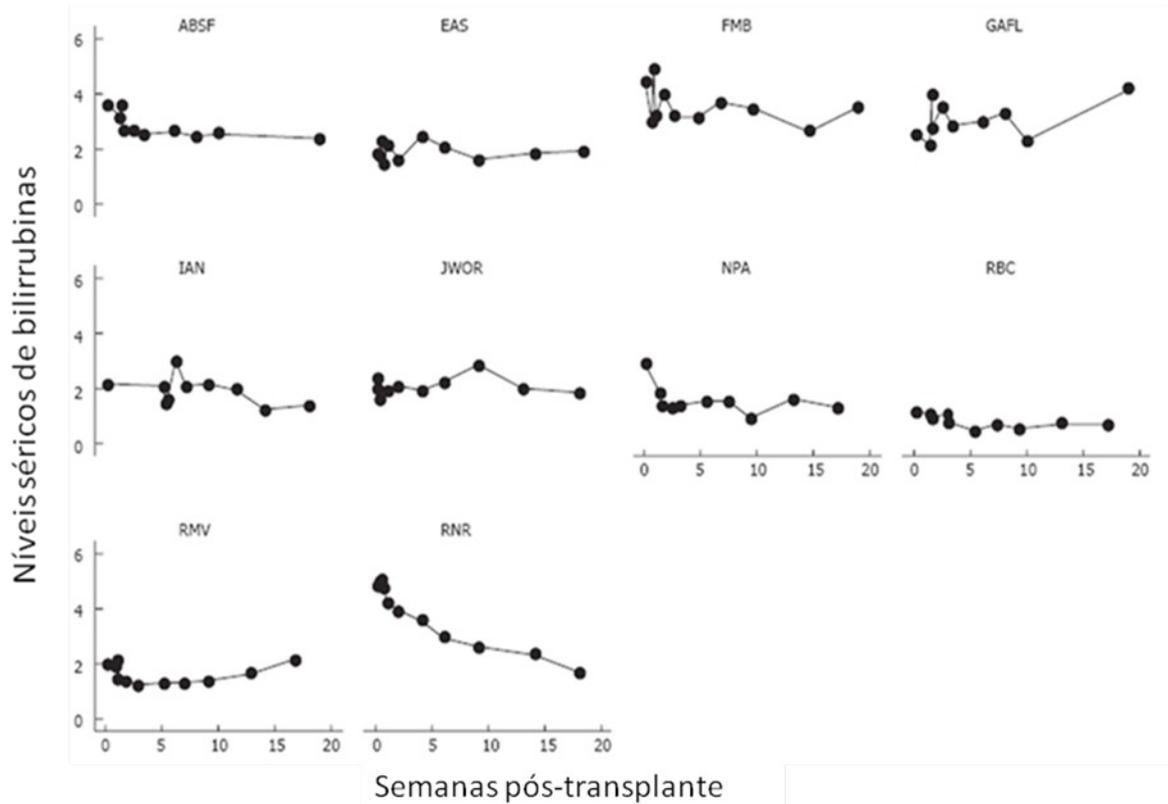


Figura 1 - Nível sérico de bilirrubinas em 10 pacientes com doença crônica hepática como avaliação de função em semanas pós-transplante autólogo de células da medula óssea.

Quando as respostas individuais foram observadas um decréscimo no nível total de bilirrubinas, em sete dos dez pacientes, após transplante de células da medula óssea (Figura 1), cabe-se salientar que a queda mais bem definida foi no paciente que recebeu a infusão com maior celularidade, e os pacientes com curvas de queda menos definidas receberam baixa celularidade e tinham vírus C da hepatite. Na avaliação conjunta o total de bilirrubina foi 21% menor no primeiro mês (2.19 ± 0.91 mg/dl) e 24% menor no quarto mês (2.10 ± 1.04 mg/dl) após a infusão de células em relação aos valores basais (2.78 ± 1.16 mg/dl) (Tabela 7). O comportamento das médias dos níveis de bilirrubinas após as infusões de células da medula óssea está demonstrado na Figura 2.

A análise individualizada das curvas dos níveis de albumina séricas demonstrou um aumento nos níveis de albumina em seis pacientes e uma redução em um paciente quatro meses após o transplante de células da medula óssea, este, submetido à infusão de 2.6×10^8 , a terceira menor celularidade associado ao fato de ser paciente portador de vírus C e alcoolismo. Houve uma queda nas curvas individualizadas na maioria dos pacientes, nas dez semanas iniciais, e recuperação e aumento até o quarto mês (Figura 3). O comportamento da média dos níveis de albumina sérica está demonstrado na Figura 4. Apesar dos níveis basais elevados em

comparação aos outros pacientes, o indivíduo que recebeu infusão com maior celularidade terminou o período de follow up com o maior nível sérico de albumina.

Os níveis de albumina foram 1% menores no primeiro mês (3.44 ± 0.52 g/dl) e 7% maior no quarto mês, após a infusão de células da medula óssea (3.73 ± 0.51 g/dl) em relação aos níveis iniciais (3.47 ± 0.51 g/dl) (Tabela 7).

Os níveis de RNI foram 1% menor no primeiro mês (1.44 ± 0.23) e 4% menores no quarto mês (1.42 ± 0.18) após o transplante em relação aos níveis iniciais (1.46 ± 0.23) (Tabela 7). Os níveis de RNI reduziram em sete pacientes e aumentou, em um paciente, após transplante de células da medula óssea (Figura 5). O comportamento da média dos níveis de RNI está demonstrado na Figura 6.

Outros dados laboratoriais relevantes tais como leucograma, hemoglobina, ALT, AST, gama-glutamil transferase e creatinina antes e após as intervenções estão demonstrados na Tabela 8. Observou-se uma tendência mais acentuada à diminuição na média de leucometria e transaminases, porém sem significância na análise estatística por ausência de robustez na diferença entre os valores iniciais, um mês e quatro meses em parâmetros com grande número de variáveis independentes da função hepática. Os outros dados da tabela 8 tiveram ainda menores variações.

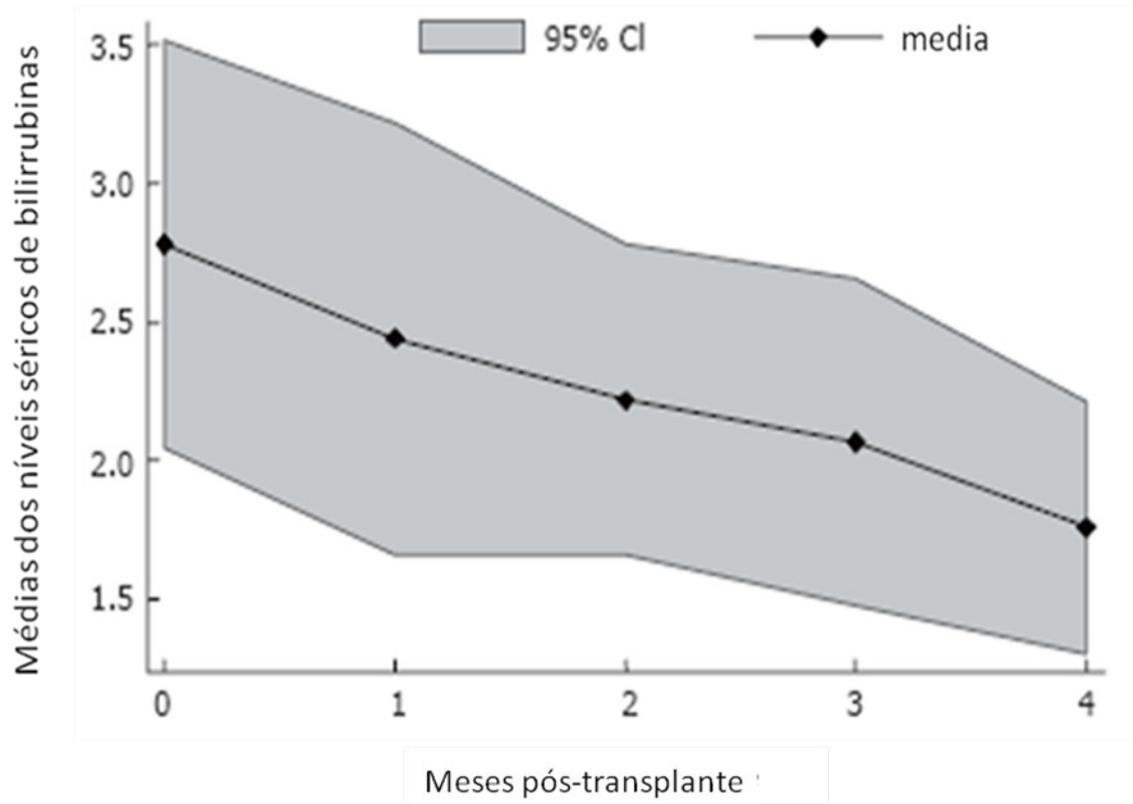


Figura 2-Médias dos níveis séricos de bilirrubinas incluindo a faixa de 95% de intervalo de confiança em 10 pacientes com doença crônica de fígado como avaliação de função em semanas pós-transplante de células da medula óssea.

Tabela 8-distribuição dos parâmetros laboratoriais em 10 pacientes com doença hepática crônica em linha de base, um mês e quatro meses após transplante de células da medula óssea.

| | Mínimo | Máximo | Média | Mediana | Desvio padrão | Varição relativa da média a partir da linha de base (%) |
|----------------------------------|--------|--------|--------|---------|---------------|---|
| Hemoglobina (g/dl) | | | | | | |
| Valores basais | 11.30 | 16.90 | 13.16 | 12.2 | 1.90 | |
| 01 mês | 9.5 | 16.00 | 12.26 | 11.95 | 1.81 | -8 |
| 04 meses | 10.30 | 15.10 | 12.80 | 12.7 | 1.47 | -3 |
| Leucometria (x 10 ³) | | | | | | |
| Valores basais | 2.60 | 4.40 | 3.94 | 4.00 | 0.97 | |
| 01 mês | 2.30 | 5.10 | 3.35 | 2.85 | 1.04 | -15 |
| 04 meses | 2.30 | 6.00 | 3.60 | 3.25 | 1.14 | -9 |
| GGT (U/L) | | | | | | |
| Valores basais | 50.00 | 543.00 | 172.20 | 139 | 147.50 | |
| 01 mês | 48.00 | 474.20 | 157.20 | 134.50 | 129.00 | -9 |
| 04 meses | 47.00 | 489.67 | 163.50 | 132.50 | 133.25 | -5 |
| AST (U/L) | | | | | | |
| Valores basais | 29.00 | 192.00 | 100.60 | 92.50 | 56.24 | |
| 01 mês | 26.00 | 173.00 | 86.90 | 79.00 | 47.58 | -14 |
| 04 meses | 29.00 | 180.00 | 85.80 | 64.00 | 46.87 | -15 |
| ALT (U/L) | | | | | | |
| Valores basais | 11.00 | 120.00 | 56.00 | 43.00 | 35.54 | |
| 01 mês | 22.00 | 115.00 | 54.80 | 42.50 | 32.71 | -2 |
| 04 meses | 27.00 | 131.00 | 53.50 | 41.00 | 34.97 | -4 |
| Creatinina (MG/dl) | | | | | | |
| Valores basais | 0.60 | 1.50 | 0.86 | 0.80 | 0.26 | |
| 01 mês | 0.70 | 1.30 | 0.90 | 0.85 | 0.20 | 5 |
| 04 meses | 0.60 | 1.20 | 0.87 | 0.85 | 0.19 | 1 |

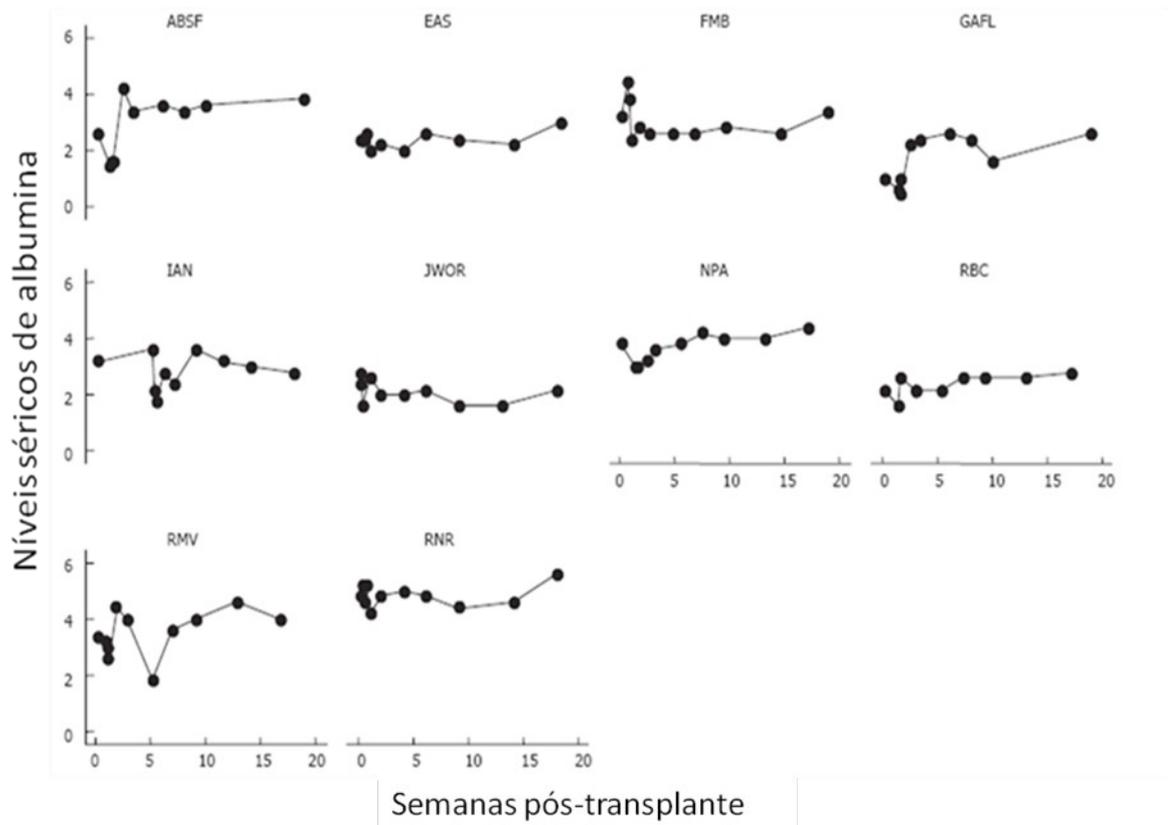


Figura 3—Níveis séricos de albumina em 10 pacientes com doença crônica de fígado como avaliação de função em semanas pós-transplante de células da medula óssea

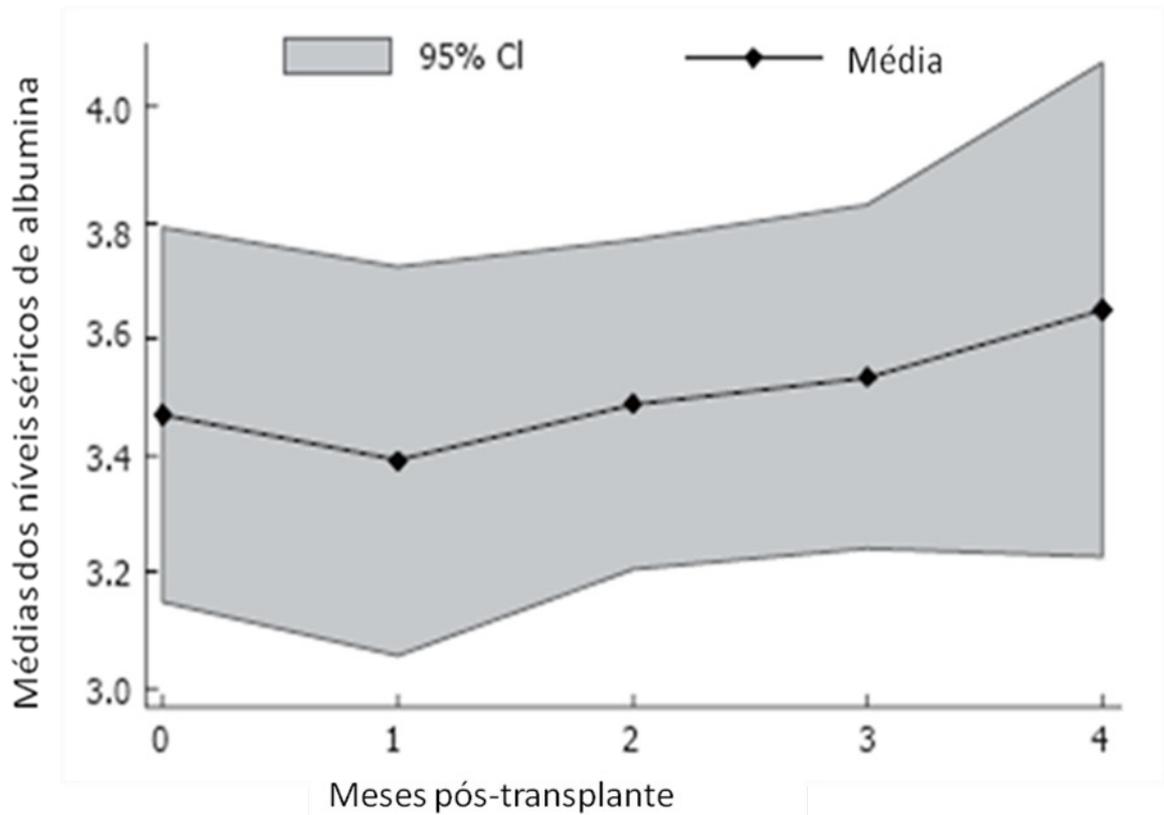


Figura 4—Médias dos níveis séricos de albumina incluindo a faixa de 95% de intervalo de confiança em 10 pacientes com doença crônica de fígado como avaliação de função em semanas pós-transplante de células da medula óssea

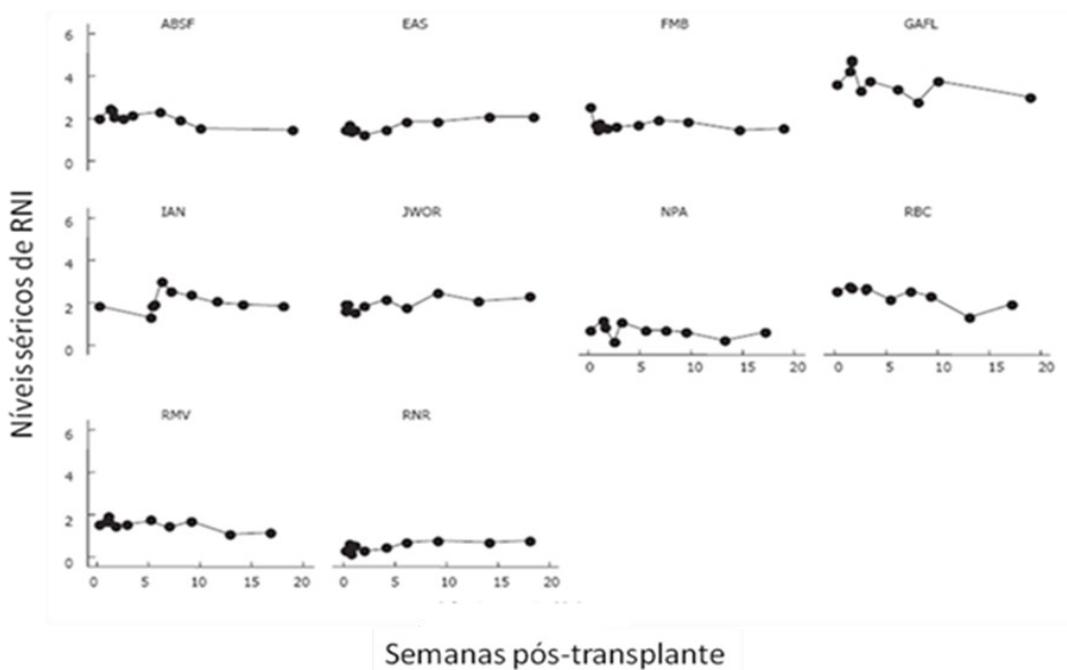


Figura 5 - Níveis de RNI em 10 pacientes com doença crônica de fígado como avaliação de função em semanas pós-transplante de células da medula óssea.

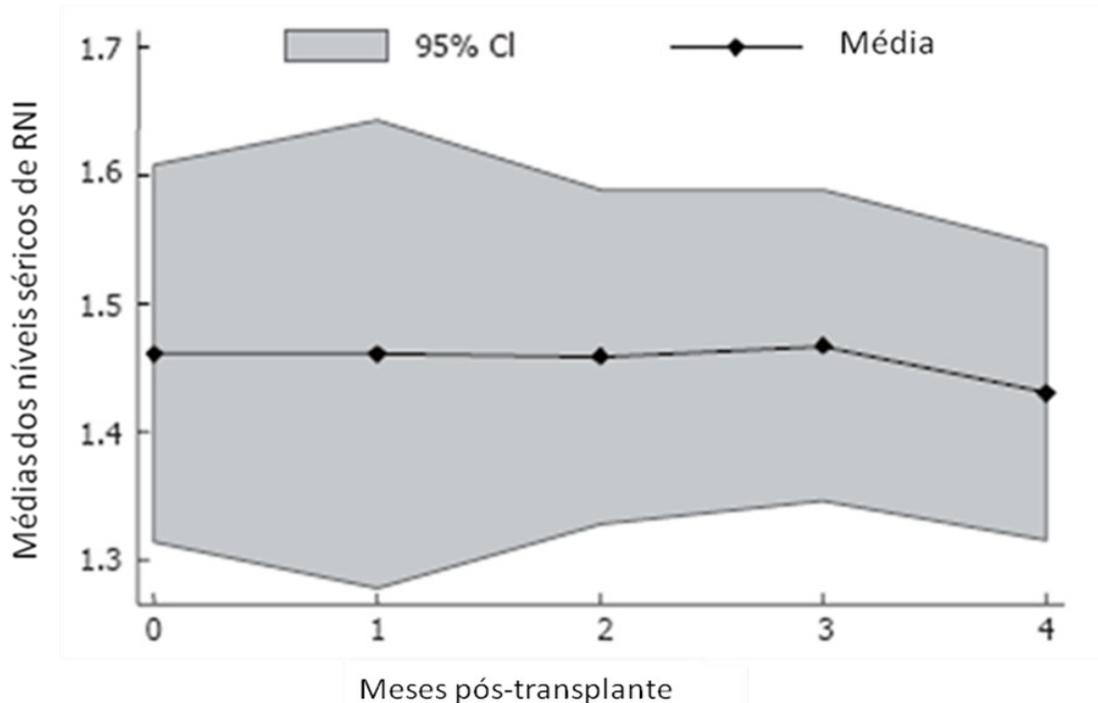


Figura 6-Médias dos níveis de RNI incluindo a faixa de 95% de intervalo de confiança em 10 pacientes com doença crônica de fígado como avaliação de função em semanas pós-transplante de células da medula óssea

7 DISCUSSÃO

Foram avaliados dez pacientes com média de idade de 52 anos (variando entre 24 e 70 anos) com quadro de doença hepática crônica, inscritos na lista de transplante ortotópico de fígado do Hospital São Rafael. Oito do sexo masculino e dois do feminino, corroborando com a estatística de maior acometimento por cirrose alcoólica e viral em pacientes do sexo masculino.

Os pacientes foram portadores das seguintes patologias: três pacientes com doença crônica alcoólica de fígado; três com hepatite crônica tipo C; dois com associação entre vírus C e alcoolismo; um com doença colestática de fígado e um com cirrose criptogênica (Tabela 6), refletindo o perfil de predominância de cirróticos de causas virais por vírus C e alcoolismo. Quanto à classificação de Child-Pugh, sete foram classificados como B e três como C, não houve pacientes classificados como A, porque estes menos comumente estariam em lista de transplante convencional.

Evitou-se a inclusão de pacientes com maior probabilidade de serem submetidos a transplante de fígado, em menor período de tempo, adotando-se a inclusão de pacientes em ordem decrescente a partir do final da lista de transplante, para não haver influencia direta da terapia

celular sobre a terapêutica convencional. Assim como não foram realizadas biopsias antes e após a terapia celular, o que poderia ser elucidativa em vários aspectos deste estudo, como a demonstração do efeito da terapia celular sobre a fibrose hepática e avaliação das características histológicas e citológicas pós-transplante, já que estes procedimentos, não são livres de complicações, e poderiam influenciar no tempo de espera em lista.

Foi realizado estudo de fase 1, utilizando-se transplantes autólogos de células de medulas ósseas, através da infusão destas pela artéria hepática de pacientes com doença crônica de fígado. A coleta de sangue por punção de medula óssea da crista íliaca foi optada por ser método seguro, já utilizado em outros estudos clínicos (TERAI et al., 2006; MOHAMADNEJAD et al., 2007) rotineiramente para mielogramas, inclusive em pacientes cirróticos e com baixos índices de complicações, desde quando realizada por especialista.

A via de acesso à artéria hepática, por punção e cateterismo da artéria femoral, foi escolhida por ser comum na utilização deste acesso para a realização de quimioembolização de tumores hepáticos, em pacientes cirróticos, com baixo índice de complicações inerentes a este acesso. E também, por que o fluxo arterial favorece a perfusão difusa do órgão com provável melhor distribuição das células infundidas. Dados corroborados em trabalhos desenvolvidos por Mohamadnejad et al., (2007) e posterior estudo de Lira et al., (2007). Os acessos por veia porta (TERAI et al., 2006) ou por veia periférica (GORDON et al., 2006) para infusão de células da medula óssea, também se demonstraram seguros e com baixo potencial de complicações.

A punção da artéria femoral para acessar a artéria hepática pode ter como complicações sangramento, hematomas, trombose e perda do cateter, contudo o Serviço de Imagem no Hospital São Rafael, tem grande experiência com radiologia intervencionista, realizando o método com baixo risco de complicações, não havendo, portanto, complicações durante o estudo.

Potenciais efeitos adversos, com a terapia celular podem ser observados, como dor em sítio de infusão, náuseas, febre, e rubor cutâneo. Esplenomegalia com o uso do G-CSF ou com a utilização da via portal para infusões, podem ocorrer, porém neste estudo os únicos efeitos adversos foram dores no sítio de punção, inclusive sem motivos aparentes, como hematoma ou infecções que justificassem a presença de dor, mantendo estas complicações no âmbito da subjetividade. Um episódio de encefalopatia hepática reversível aos 33 dias da infusão de

células da medula óssea em paciente de 70 anos, portador de cirrose alcoólica, não foi considerado como evento adverso do procedimento, já que episódios idênticos foram observados previamente no último ano.

Em estudo realizado por Mohamadnejad et al., (2007) onde avaliaram quatro pacientes com cirrose descompensada e em lista de transplante com metodologia semelhante a este estudo, submetidos a transplante de células tronco isolados da medula óssea, colhidos em crista ilíaca, porém separadas e purificadas com obtenção de células predominantemente CD34 e infundidas através da artéria hepática. Um paciente desenvolveu síndrome hepatorenal e faleceu após transplante ortotópico de fígado.

Um aspecto importante na terapia celular com células mononucleares é a possibilidade de utilização autóloga destas células, pois estas estão presentes em vários tecidos do indivíduo, o que evitaria eventuais processos de rejeição imunológica das células transplantadas no paciente. Nenhum processo associado à rejeição foi relatado neste estudo, assim como em estudo com células autólogas na literatura (TERAI et al., 2006; GORDON et al., 2006).

A maioria dos estudos clínicos com CT não foi controlada e avaliaram um número pequeno de pacientes. Avaliaram os efeitos da infusão de células autólogas da medula óssea, da mobilização de CT com fator estimulador de colônias de granulocitos (G-CSF), da cultura e da infusão de células da medula óssea na regeneração hepática após injúria do órgão como hepatectomia. Em geral estes trabalhos apontaram para efeitos benéficos com a terapia celular. Este estudo, que avaliou os efeitos da infusão de células autólogas da medula óssea, tem um número pequeno de pacientes e acompanhamento por um curto período de tempo, portanto, não devidamente adequado para análise de efeitos, porém indicativo de que a terapia celular traz benefícios e pode ser realizada com segurança.

Além do objetivo do estudo de fase 1, tendo demonstrado a segurança e exequibilidade, observou-se mudanças nos parâmetros de função hepática após o transplante autólogo de células provenientes da medula óssea em pacientes portadores de doença crônica de fígado. Quatro meses após os procedimentos as médias de bilirrubinas séricas e RNI decresceram, enquanto os níveis séricos de albumina aumentaram. Sete pacientes apresentaram redução dos níveis de bilirrubinas e seis apresentaram aumento nos níveis de albumina.

Deve-se salientar, que a redução mais significativa dos níveis de bilirrubinas foi observada em paciente de 24 anos (R.N.R.) com doença coleostática crônica de figado, único com este tipo de acometimento, e com maior número de celularidade infundida ($13,1 \times 10^8$ células da medula óssea) em comparação aos outros procedimentos (tabela 1). A menor celularidade foi obtida em paciente de 70 anos, cirrótico causado por hepatite alcoólica, porém se tomarmos como ponto de corte as celularidades menores que 3.0×10^8 , três pacientes seriam incluídos nesta estratificação, sendo dois destes, portadores de vírus C, apoiando a possibilidade de mielosupressão, induzida por alcoolismo e vírus C, o que não aconteceu com o paciente portador de doença coleostática. Esta diferença entre pacientes, provavelmente, influenciada pela idade e etiologia da cirrose, necessita de esclarecimento e estratificação em novos estudos devidamente randomizados, inclusive para identificação de quais grupos verdadeiramente se beneficiarão com estes transplantes.

O uso de G-CSF em pacientes com doença hepática crônica, baseia-se em estudos experimentais que apontam aumento da regeneração hepática após hepatectomia em relação aos controles (PISCAGLIA et al., 2007).

Neste estudo, não foram utilizadas substâncias que pudessem recrutar ou aprimorar a função das células obtidas da medula óssea, porém, estudos mais recentes, usando substâncias como fator estimulador de Colônias (G-CSF), no intuito de promover a mobilização das células provenientes da medula óssea foram realizados. Gaia et al., (2006) avaliaram a exequibilidade e segurança da mobilização de células da medula óssea em oito pacientes, em fase terminal, de cirrose hepática após uso de G-CSF. A mobilização (monitorizada pelo número de células CD34+) foi observada em todos os pacientes, processo este bem tolerado e sem efeitos adversos.

Estudos subseqüentes serão necessários para avaliar qual produto tem melhor efeito sobre recrutamento e funcionalidade das células como o realizado por Lira et al., (2007) que também não observaram efeitos adversos com o uso de G-CSF e com benefício terapêutico. Ainda no estudo de Gaia et al., (2006). Não houve rotura de baço em nenhum caso, mas houve aumento do volume (média basal de 15 cm para 18 cm), variável esta não existente neste estudo devido a não utilização de G-CSF.

Neste trabalho, foi observado um decréscimo no nível total de bilirrubinas em sete dos dez pacientes após transplante de células da medula óssea e um aumento nos níveis de albumina em seis pacientes (Figura 1). Gordon et al., (2006) também obtiveram efeito benéfico com transplante de células autólogas de medula óssea, onde três dos cinco pacientes apresentaram uma redução nos níveis séricos de bilirrubinas e quatro de cinco apresentaram aumento nos níveis de albuminas. Neste estudo a queda mais bem definida dos níveis de bilirrubinas, ocorrida, foi no paciente que recebeu a infusão com maior celularidade e os pacientes com curvas de queda menos definidas receberam baixa celularidade e tinham predominantemente vírus C da hepatite. Na avaliação conjunta o total de bilirrubina foi 21% menor no primeiro mês (2.19 ± 0.91 mg/dl) e 24% menor no quarto mês (2.10 ± 1.04 mg/dl) após a infusão de células em relação aos valores basais (2.78 ± 1.16 mg/dl) (Tabela 7).

A análise individualizada das curvas dos níveis de albumina séricas demonstrou um aumento nos níveis de albumina em seis pacientes e uma redução em um paciente, quatro meses após o transplante de células da medula óssea, este, submetido à infusão de 2.6×10^8 , a terceira menor celularidade associada ao fato de ser em paciente portador de vírus C e alcoolismo.

Apesar dos níveis basais elevados em comparação aos outros pacientes, o indivíduo que recebeu infusão com maior celularidade terminou o período de “follow-up” com grande nível sérico de albumina o que pode indicar uma melhor sustentabilidade clínica, em pacientes transplantados, com maior número de células mononucleares, ou somente refletir o melhor estado clínico por afecção menos agressiva.

Os níveis de albumina foram 1% menores no primeiro mês (3.44 ± 0.52 g/dl) e 7% maior no quarto mês, após a infusão de células da medula óssea (3.73 ± 0.51 g/dl) em relação aos níveis iniciais (3.47 ± 0.51 g/dl) (Tabela 7). O mesmo padrão de queda inicial da curva de níveis séricos de albumina e posterior recuperação e aumento dos níveis finais da curva, foi observado por Terai et al., (2006).

Os níveis de RNI foram 1% menor no primeiro mês (1.44 ± 0.23) e 4% menores no quarto mês (1.42 ± 0.18) após o transplante em relação aos níveis iniciais (1.46 ± 0.23) (Tabela 7). Os níveis de RNI reduziram em sete pacientes e aumentou em um paciente após transplante de células da medula óssea (Figura 5). Porém as variações foram de pouca consistência necessitando de curvas mais definidas.

Neste estudo não foi realizada a caracterização ou purificação das células infundidas como no trabalho de Gordon et al., (2006) mas, sim células mononucleares obtidas em gradiente de ficoll-hypaque. A não purificação de células com culturas ou expansões *in vitro*, faz com que células mononucleares medulares diferentes, como as mesenquimais, hematopoiéticas e macrófagos fossem infundidas, porém minimizam os questionamentos quanto ao potencial de oncogênese das terapias celulares que está mais relacionado com a utilização de culturas e métodos realizados. Neste estudo não houve cultura ou expansão *in vitro*.

Neste trabalho não foram avaliados grupos controles, assim como em outros trabalhos clínicos (GORDON et al., 2006; TERAJ et al., 2006), em literatura atual, foram questionados alguns pontos deste estudo, como tempo curto de acompanhamento (quatro meses), diferenças não robustas entre os níveis de albumina e bilirrubinas, no início e no final do estudo, a influência de fatores externos como medicamentos utilizados e a não pureza das células infundidas, porém, deve-se ressaltar que o objetivo de avaliar segurança e exequibilidade foi alcançado e permitiu novo estudo realizado pelo mesmo grupo, randomizado e controlado, demonstrando aumento significativo dos níveis de albuminas em relação aos controles (aumento de 16% VS 2% em relação à linha de base; $P.034$) e decréscimo no escore Child-Pugh (CP) em relação à linha de base (8% VS 4%; $P. 017$). Estes dados substanciam o provável efeito benéfico da terapia celular (LIRA et al., 2007).

Foi também observado neste estudo queda de dois pontos no escore de Child-Pugh em dois pacientes, como também, houve queda de dois pontos ou mais no escore de Child-Pugh de quatro pacientes, aumento do escore em um paciente, e inalterado ou com queda menor que dois pontos, em três pacientes em estudo subsequente de Lira et al., (2007). Apontando para um efeito clínico benéfico e com a evolução do conhecimento com manejo de CT, possíveis impactos nas indicações de transplantes de órgãos podem se tornar realidade.

A utilização adequada de terapia com CT requererá também o conhecimento dos fatores celulares que estimulem a migração, a proliferação e a diferenciação das células-tronco adultas, que poderão ser utilizados isoladamente, ou em conjunto para potencializar ou regular as ações das células-tronco residentes no tecido alvo ou de outras populações administradas ou mobilizadas para a área de reparo.

8 CONCLUSÃO

-O transplante autólogo de células da medula óssea, infundidas via arterial hepática, em pacientes com doença crônica do fígado é exequível e seguro, conforme demonstrado neste trabalho;

-Efeitos benéficos como achados laboratoriais com aumento de albumina e tempo de protrombina, e com redução de bilirrubinas indicaram melhora da função hepática;

-Não houve efeitos adversos significativos em nenhuma fase deste estudo, nem na obtenção das células, nem na infusão das mesmas e tão pouco no acompanhamento dos pacientes. Foi demonstrado segurança para seguimentos posteriores utilizando metodologia similar e utilizando-se recursos para aprimoramento do recrutamento e funcionalização das células medulares;

-Houve queda no Escore Child-pugh de dois pacientes apontando para benefício clínico na utilização de terapia celular com células da medula óssea em pacientes com doença crônica de fígado;

-Novos estudos controlados, randomizados e duplos cegos, com avaliação de novos marcadores, avaliação de qualidade de vida e novos parâmetros clínicos além de escores como MELD e Child-Pugh são necessários;

-O acompanhamento dos pacientes e avaliação do impacto do transplante celular na saúde pública, através de modificações na sobrevida de pacientes em lista de transplante ortotópico de fígado ainda necessitarão de novas análises após seguimento por tempo adequado e com número mais significativo de pacientes.

REFERÊNCIAS

[AICHER, A.](#); [ZEIHER, A. M.](#); [DIMMELER, S.](#) Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. **Epub**, v. 45, n. 3, p. 321-5, 2005.

ALISON, M. R.; POULSOM, 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.

ALVAREZ-DOLADO, M.; PARDAL, R. et al., Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, v. 425, n. 6961, p. 968-73, 2003.

AVITAL, I.; INDERBITZIN, D. et al., Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 288, n. 1, p. 156-64, 2001.

CHIBA, T.; KITA, K.; ZHENG, Y. W. et al., Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology*, v. 44, p. 240–51, 2006.

DIARMAID, H. D. et al., Critical Review of Clinical Trials of Bone Marrow Stem Cells in Liver Disease. *Gastroenterology*, v. 135, p. 438–450, 2008.

Di BISCEGLIE, A. M. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology*, v. 31, n. 4, p. 1014-8, 2000.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, v. 279, n. 5356, p. 1528-30, 1998.

FORBES, S. J.; RUSSO, F. P.; REY, V. et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, v.126, p.955–63, 2004.

FUJIO, K.; EVARTS, R. P. et al. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest*, v. 70, n. 4, p. 511-16, 1994.

FURST, G.; SCHULTE, A. M.; ESCH, J.; POLL, L.W. et al. Portal vein embolisation and autologous CD133_ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology*, v. 243, p. 71–179, 2007.

GAIA, S.; SMEDILE, A.; OMEDE, P.; OLIVERO, A.; SANAVIO, F.; BALZOLA, F.; OTTOBRELLI, A.; ABATE, M. L.; MARZANO, A.; RIZZETTO, M.; TARELLA, C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatology*, v. 45, p. 13-19, 2006.

[GOODELL, M. A.](#); [BROSE, K.](#); [PARADIS, G.](#); [CONNER, A. S.](#); [MULLIGAN, R. C.](#) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, v. 83, v.4, p. 1797-806, 1996.

GORDON, M. Y.; LEVICAR, N.; 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, p. 1822-30, 2006.

HATTORI, K.; HEISSIG, B. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. **Nat Med**, v. 8, n. 8, p. 841-49, 2002.

HORWITZ, E. M.; PROCKOP, D. J. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med**, v. 5, n. 3, p. 309-13, 1999.

JANG, Y. Y.; COLLECTOR, M. I.; BAYLIN, S. B. Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **Nat Cell Biol**, v. 6, p. 532-39, 2004.

JIANG, Y.; B. VAESSEN, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Exp Hematol**, v. 30, n. 8, p. 896-904, 2002.

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

KEEFFE, E. B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. **Gastroenterology**, v. 120, n. 3, p. 749-62, 2001.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med**, v. 349, n.6, p. 570-82, 2003.

_____ ; R. L. KATZ, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. **N Engl J Med.**, v. 346, n. 10, p. 738-46, 2002.

LAGASSE, E.; CONNORS, H.; AL-DHALIMY, M.; REITSMA, M.; DOHSE, M.; OSBORNE, L.; WANG, X.; FINEGOLD M.; WEISSMAN, I.L.; GROMPE, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. **Nat Med**, v.6, p.1229-234, 2000.

LYRA, A. C.; SOARES, M. B.; SILVA, L. F.; FORTES, M. F. et al., Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. **World J Gastroenterol**, v.13, p. 1067-73 2007.

_____. SOARES, M. B.; SILVA, L. F.; FORTES, M. F. et al., A pilot randomised controlled study used to evaluate efficacy of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with advanced chronic liver disease (abstr). **Hepatology**, v. 46. 2007. (Suppl 1) 271A.

MALLET, V. O.; C. MITCHELL, et al. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified *in vivo*. **Hepatology**, v. 35, n. 4, p. 799-804, 2002.

MEDVINSKY, A.; SMITH, A. Stem cells: Fusion brings down barriers. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 823-25, 2003.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1779-782, 2000.

MOHAMADNEJAD, M.; ALIMOGHADDAM, K.; MOHYEDDIN-BONAB, M. et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. **Arch Iran Med**, v. 10, p. 459-66, 2007.

OKUMOTO, K.; T. SAITO, 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**, v. 304, n. 4, p. 691-95, 2003.

OYAGI S, HIROSE M, KOJIMA M, et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCL4-injured rats. **J Hepatology**, v. 44, p. 742-48, 2006.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v. 107, n. 18, p. 2294-302, 2003.

PETERSEN, B. E.; BOWEN, W. C., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1168-170, 1999.

PISCAGLIA, A. C.; SHUPE, T. D. et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. **Gastroenterology**, v. 133, p. 619-31, 2007.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-47, 1999.

POTTEN, C. S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development**, v. 110, n. 4, p. 1001-20, 1990.

RASKO, J. E. Transdifferentiation: an attractive concept in search of evidence. **Pathology**, v. 35, n. 1, p. 5, 2003.

ROSKAMS, T. A.; THEISE, N. D.; BALABAUD, C. et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reaction in human livers. **Hepatology**, v. 39, p. 1739-745, 2004.

RUSSO, F. P.; ALISON, M. R.; BIGGER, B. W. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 130, p. 1807-821, 2006.

SAKAIDA, I.; TERAII, S.; NISHINA, H.; OKITA, K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. **Med Mol Morphol**, v. 38, p. 197-202, 2005.

_____. _____. YAMAMOTO, N.; AOYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; NISHINA, H.; OKITA, K. T. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. **Hepatology**, v. 40, p. 1304-311, 2004.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp Neurol.**, v. 164, n. 2, p. 247-56, 2000.

SOARES, M. B. P.; GARCIA, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Células-tronco adultas. In: Marcelo Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007, p. 25-38.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 95, n. 23, p. 13726-731, 1998.

TERAI, S.; ISHIKAWA, T.; OMORI, K. et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. **Stem Cells**, v. 24, p. 2292-98. 2006.

THEISE, N. D.; BADVE, S. et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. **Hepatology**, v. 31, n.1, p. 235-40, 2000.

_____. NIMMAKAYALU, M. et al. Liver from bone marrow in humans. **Hepatology**, v. 32, n. 1, p. 11-16, 2000.

_____. SAXENA R.; PORTMANN, B. C.; THUNG, S. N.; YEE, H.; CHIRIBOGA, L.; KUMAR, A.; CRAWFORD, J. M. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. **Hepatology**, v. 30, p. 1425-433, 1999.

THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Overview of recent experimental studies on liver stem cells. **Semin Liver Dis**, v. 23, n. 4, p.303-12, 2003.

_____. _____. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. **Hepatology**, v.43, p.2-8, 2006.

VASSILOPOULOS, G.; WANG, P. R. et al. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 901-4, 2003.

WANG, X.; WILLENBRING, H. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 897-901, 2003.

YASUI, O.; MIURA, N.; TERADA, K.; KAWARADA, Y.; KOYAMA, K.; SUGIYAMA, T. Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. **Hepatology**, v. 25, p. 329-334, 1997.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: “TERAPIA CELULAR PELO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇA PARENQUIMATOSA CRÔNICA DE FIGADO”.

INFORMAÇÕES

Você está sendo convidado para participar deste estudo clínico. As informações a seguir descrevem o estudo e o seu papel como um possível participante. O seu médico irá responder a qualquer pergunta que você possa ter sobre este Termo de Consentimento Livre Esclarecido e sobre o estudo. Você só deve participar depois de ler e entender o Termo de Consentimento Livre Esclarecido e só depende de sua vontade participar ou não. Por favor, leia estas informações com cuidado e se quiser, discuta-as com outras pessoas. Se houver qualquer coisa que não esteja clara pergunte ao seu médico do estudo.

1) Qual é o objetivo do estudo?

O objetivo deste estudo é avaliar se o transplante de células retiradas da medula do osso do próprio paciente é seguro para o tratamento de pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado (cirrose) em lista de transplante. Este é um tratamento experimental, cujo objetivo é avaliar os efeitos agudos e crônicos do transplante de células-tronco da medula óssea para o fígado, em pacientes com doença parenquimatosa crônica de fígado (cirrose) em lista para transplante hepático.

Por se tratar de células retiradas da própria pessoa não há problemas de rejeição, mas ainda não está estabelecido o comportamento dessas células em seres humanos com cirrose. No modelo animal, nenhum efeito adverso foi observado. Possíveis efeitos adversos do implante das células no fígado (não relatados em literatura) serão acompanhados de forma criteriosa e as medidas necessárias para a sua correção, implementadas imediatamente.

2) Por que estou sendo convidado para participar?

Você está sendo convidado para participar porque tem o diagnóstico de doença crônica parenquimatosa do fígado, cirrose em fase descompensada, e se encontra em lista para o transplante hepático.

3) Eu tenho que participar?

A sua participação é totalmente voluntária, ou seja, só depende de sua vontade participar ou não. Se você decidir participar, você receberá este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para guardar e será pedido que você assine e date. Se você decidir participar, você ainda estará livre para mudar de idéia ou desistir a qualquer momento e sem dar motivo. Uma decisão de sair a qualquer momento, ou de não participar, não irá afetar o padrão de atendimento que você recebe.

4) O que irá acontecer comigo se eu participar?

Depois de você ter assinado este termo de consentimento livre e esclarecido, além das visitas médicas programadas para o seu acompanhamento enquanto na lista de transplante você será acompanhado pelo médico do estudo, do Serviço de Hepatologia do Hospital S. Rafael e da Universidade Federal da Bahia. Seu acompanhamento constará de exame clínico e exames de sangue (testes laboratoriais). No dia do tratamento você será internado, quando então serão retiradas células da sua medula óssea. Durante o procedimento da punção medular você será submetido a sedação leve e anestesia local para que não haja desconforto. O procedimento consiste de colocar uma agulha no osso da bacia e posterior aspiração de cerca de 50 ml de medula óssea. As células retiradas serão preparadas em laboratório em condições estéreis, e posteriormente infundidas na sua artéria hepática (a artéria que leva sangue ao fígado). Estes exames aos quais você será submetido, punção da artéria hepática por cateterismo (sob anestesia local) e coleta de material da medula óssea (sob sedação), poderão trazer algum desconforto leve e tolerável nos locais de punção. Mais raramente pode ocorrer infecção no local de punção.

Por medida de observação e segurança você ficará internado durante 3 dias, com avaliações clínicas e laboratoriais pela equipe médica do estudo. Terá alta no 3º dia e será acompanhado

pela mesma equipe, a nível ambulatorial, com consultas médicas após 7 dias, 14 dias, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias.

Se a qualquer momento chegar a sua vez de ser transplantado, você terá seus direitos assegurados e será preparado para a cirurgia sem haver nenhuma modificação ou prejuízo quanto a realização do transplante hepático, independente de ter sido submetido à infusão de células-tronco. Esclarecemos que a infusão de células-tronco está sendo testada como uma nova alternativa de tratamento.

Quais são os possíveis riscos, desconfortos ou desvantagens envolvidas?

Os procedimentos, mielograma ou cateterismo da artéria hepática (punção da artéria), são feitos sob sedação e podem causar desconforto, geralmente leve e tolerável, como dolorimento local que usualmente é passageiro e quase sempre não necessita de uso de analgésicos. Às vezes pode ocorrer equimose local (hematoma). Como estes procedimentos serão realizados sob controle médico e hospitalar, é mínima a possibilidade de infecção.

6) Quais são os possíveis benefícios ao participar?

Se a introdução de suas células da medula óssea (células-tronco) desempenharem um papel favorável na recuperação das funções do fígado, o seu fígado, atualmente insuficiente, poderá recuperar-se parcialmente e permitir a você a condição de esperar na lista de transplante por período maior, enquanto aguarda um órgão doador.

Se for constatada a observação de poucos efeitos colaterais com este tipo de tratamento, permitirá no futuro, o seu uso mais abrangente para outros pacientes com doenças do fígado.

7) Contatos com informações adicionais

O seu médico e equipe do estudo irão responder a qualquer pergunta que você possa ter. Se você tiver perguntas adicionais sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, e, sobre a ética do estudo, você deve dirigir-se inicialmente aos investigadores. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou na ocorrência de uma lesão relacionada ao estudo ou se qualquer outro problema surgir, contate Dr. Luiz Lyra no tel. (71) 99614098, ou Dr. André Lyra no tel.

(71) 91430224, ou Dr. Marcos Fortes no tel. (71) 88023774. Se ainda persistirem dúvidas, você poderá encaminhá-las para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael.

8) Quem revisou o estudo?

O Comitê de Ética em pesquisa do Hospital São Rafael (que é um grupo de pessoas formado para revisar a ética do estudo e garantir os direitos dos pacientes) revisou e aprovou o protocolo do estudo e a participação do seu médico e equipe da pesquisa.

9) E quanto a autorizar o uso das minhas informações médicas?

O acesso ao seu prontuário médico, bem como atos de auditoria (fiscalização) médica só poderão ocorrer se obedecerem às leis do Brasil e às regras do Conselho Federal de Medicina. As leis brasileiras lhe dão o direito de controlar o uso de suas informações médicas e o acesso a elas. Ainda assim o médico responsável pelo estudo e autoridade responsável por seus prontuários médicos devem estar de acordo com o acesso aos seus registros médicos para que o mesmo aconteça. Os pesquisadores comprometem-se a manter sigilo sobre seus dados, entretanto, os resultados poderão ser divulgados em publicações de revistas científicas ou em congressos médicos.

AUTORIZAÇÃO DO PACIENTE AO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Após ter lido e entendido este termo de consentimento, uma vez estando de acordo, você autoriza e assina o que está abaixo descrito :

1→ Eu confirmo que li e entendi o termo de consentimento livre e esclarecido do estudo.

2→ Eu estou consciente que eu posso me recusar a participar do estudo. Entendo que a minha participação é voluntária, que posso sair do estudo quando desejar e que isto não vai afetar o meu tratamento médico.

3→ Eu estou consciente que enquanto o estudo estiver sendo realizado eu não serei identificado por quaisquer pessoas de fora do estudo e que os meus resultados serão confidenciais mas poderão ser usados, pelos pesquisadores, para a informação científica.

4→ Se eu apresentar algum problema que eu suspeite que seja resultado do meu envolvimento no estudo, eu estou ciente que devo falar com o meu médico. Conheço e posso telefonar, se

necessário, para os Drs. Marcos Fortes (telefone: 71-8802-3774), André C. Lyra (tel 71-9143-0224) Luiz Lyra (tel 71 99614098), e Ricardo Ribeiro dos Santos (71-9199-4252).

5→ Eu concordo em participar do estudo acima citado.

6→ Eu receberei uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado e datado. Fui informado que o original deste termo de consentimento, assinado e datado, ficará guardado nos arquivos do meu médico do estudo.

Nome completo do paciente

Data

Assinatura do paciente

Data

Eu expliquei ao paciente _____ o projeto de pesquisa e os efeitos do tratamento. Acredito que ele (a) tenha compreendido a minha explicação e que deu o seu consentimento de livre e espontânea vontade.

Nome completo do Pesquisador

Data

Assinatura do Pesquisador

Data

Testemunha 1

Nome: _____

R.G.=

Testemunha 2

Nome: _____

R.G.=