

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOQUÍMICA)

ÉRICA MOREIRA DE OLIVEIRA

**“DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM HEPATÓCITOS E
DESENVOLVIMENTO DE MODELO PRÉ-CLÍNICO DE FIBROSE HEPÁTICA PARA
ENSAIOS DE TERAPIA CELULAR”**

VERSÃO CORRIGIDA DA TESE CONFORME RESOLUÇÃO COPGR 5890
O ORIGINAL SE ENCONTRA DISPONÍVEL NA SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DO IQ-USP

SÃO PAULO

DATA DO DEPÓSITO NA SPG:
16/08/2013

ÉRICA MOREIRA DE OLIVEIRA

**“DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM HEPATÓCITOS E
DESENVOLVIMENTO DE MODELO PRÉ-CLÍNICO DE FIBROSE HEPÁTICA PARA
ENSAIOS DE TERAPIA CELULAR”**

*Tese apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Anna Carla Renata Krepel Goldberg

São Paulo
2013

ÉRICA MOREIRA DE OLIVEIRA

**“DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM HEPATÓCITOS E DESENVOLVIMENTO DE
MODELO PRÉ-CLÍNICO DE FIBROSE HEPÁTICA PARA ENSAIOS DE TERAPIA CELULAR”**

*Tese apresentada ao
Instituto de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do
título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Orientadora. _____

Prof. Dra. Anna Carla Renata Krepel Goldberg

*Aos meus pais João Batista e Maria da Glória, aos meus irmãos Maria Aparecida e Isaac, a minha cunhada Lídia, aos meus sobrinhos Natally e João Batista e a minha amiga Thaís, por todo carinho e suporte.
A vocês minha gratidão eterna.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

A minha orientadora Profa. Dra. Anna Carla Renata Krepel Goldberg, por ter me aceitado como sua aluna de doutorado e permitir a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Mari Sogayar, por ter me aceitado em seu grupo e Laboratório, onde grande parte deste trabalho foi realizada.

A Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) do Instituto de Química–USP, pela eficiência, pela atenção e pelo carinho no trabalho prestado aos alunos de Pós-Graduação.

A toda minha família, por todo apoio, toda paciência e toda compreensão.

A Thaís Bifano, pelo enorme apoio emocional, sempre me lembrando o quanto eu posso e de que sou capaz.

A Márcia Teles, pelo apoio emocional durante o período de preparação para a defesa desta tese.

Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno por ter me ensinado a técnica de hepatectomia de 70%.

Ao Rômulo Carvalho, por toda contribuição no desenvolvimento no modelo pré-clínico de fibrose hepática e no isolamento e manutenção de células-tronco de cordão umbilical humano.

A Marluce Mantovani, Vanessa Pazzini e Carla Piccinato pela contribuição no desenvolvimento do modelo pré-clínico de fibrose hepática.

Ao Dr. Fernando Lojudice por me passar seus conhecimentos sobre o isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais de sangue e veia de cordão umbilical humano.

A todos os estudantes e ao corpo técnico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, da Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas e do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital Israelita Albert Einstein, obrigada pelo incentivo e pela amizade.

A Fernanda Paladino, a Dra. Janaína Munuera, a Joana Cruz e Vanessa Pazzini pela ajuda diária no laboratório.

A Dra. Janaína Munuera pelo auxílio nos ensaios de imunofluorescência.

A Fernanda Paladino pelo auxílio com a citometria de fluxo e análise de dados.

A Lilian Buzzetto pela contribuição nas análises de PCR em tempo real e a Marília Normanton e Fernanda Paladino que tantas vezes me auxiliaram no processamento das placas enquanto eu estava elaborando esta tese.

A Dra. Eliane Antonioli, Suzana Benedito e Daniela Bucci, por terem cedido células-tronco mesenquimais de medula óssea humana a este projeto.

Ao CNPq e ao Instituto UNIEMP pela bolsa concedida.

Este projeto foi mantido por auxílios concedidos pelo CNPq (573578/2008-7) e FAPESP (2007/54260-2).

RESUMO

Oliveira, E.M. **Diferenciação de células-tronco em hepatócitos e desenvolvimento de modelo pré-clínico de fibrose hepática para ensaios de terapia celular.** 2013. 120 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais (CTM) em hepatócitos e a padronização de um modelo animal de fibrose hepática induzida por dimetilnitrosamina (DMN) para ensaios pré-clínicos de transplante de CTM. CTM isoladas de fontes variadas apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico e o padrão de marcadores de superfície celular esperado na análise por citometria de fluxo. A capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica dessas células foi comprovada pelas colorações de vermelho de alizarina, *oil red* e azul de toluidina, respectivamente, confirmando, que as células isoladas para este estudo se comportaram como CTM conforme proposto pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Células-tronco. A diferenciação hepática foi avaliada quanto à morfologia e capacidade das células diferenciadas de estocar glicogênio confirmada por PAS (ácido periódico-Schiff), de sintetizar albumina confirmada por imunofluorescência, além da capacidade de expressar genes hepato-específicos verificada por ensaios de PCR em tempo real. Com base na literatura para diferenciação hepática, diferentes protocolos de um, dois e três passos foram testados. CTM humanas mostraram capacidade de produzir e estocar glicogênio e de sintetizar albumina, apenas quando diferenciadas com protocolos de três etapas, porém sem uma expressão aumentada dos genes hepato-específicos albumina, α -

fetoproteína e c-Met. Uma etapa de diferenciação endodérmica, previamente aplicada à diferenciação hepática, aumentou a capacidade de produzir e estocar glicogênio das CTM diferenciadas. Para a padronização do modelo de fibrose hepática induzida por DMN, foram realizados experimentos de dose-resposta e foi verificado o efeito da hepatectomia em modelos mistos DMN/hepatectomia. A injúria hepática e o efeito do transplante de CTM foram avaliados por análise macroscópica dos fígados, histologia das biópsias de fígados corados com HE e tricromo de Masson e parâmetros bioquímicos séricos. Alterações macroscópicas, histológicas e nos níveis séricos de fosfatase alcalina indicam a indução da fibrose hepática nos ratos Wistar tratados com DMN na dose de 10 µg/g de peso animal por três dias consecutivos durante quatro semanas, mas não observamos nenhum efeito induzido pela hepatectomia. Porém, este modelo com DMN se mostra semelhante a estágios iniciais de uma fibrose hepática. O transplante de 1×10^7 CTM de veia de cordão umbilical humano (VCUH) no modelo de injúria hepática induzida por DMN não resultou em melhora da fibrose, diminuição dos níveis séricos de fosfatase alcalina e nem em ganho de peso dos animais quando comparados aos animais tratados com PBSA após a injúria hepática (grupo placebo). Em conjunto, esses resultados sugerem que CTM humanas se diferenciam após tratamentos mais complexos, onde os indutores hepatogênicos são sequencialmente adicionados ao meio de modo a mimetizar a sinalização durante o desenvolvimento embrionário. O transplante de CTM de VCUH parece não ter efeito positivo em um modelo pré-clínico de injúria hepática similar a estágios iniciais de fibrose. Financiados por CNPq (573578/2008-7) e FAPESP (2007/54260-2).

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, diferenciação hepatogênica, terapia celular, fibrose hepática, dimetilnitrosamina.

ABSTRACT

Oliveira, E.M. **Mesenchymal stem cell differentiation in hepatocytes and development of pre-clinic model of hepatic fibrosis for cellular therapy assays**

2013. 120 pages. PhD Thesis – Graduate Programme in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This study aimed to develop an *in vitro* differentiation protocol of mesenchymal (MSC) stem cells to hepatocytes and to standardize an animal model for hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN) for preclinical transplant assays of MSC. MSC isolated from various sources presented fibroblastoid morphology, plastic adherence, and the expected pattern of cell surface markers by flow cytometry analysis. The capacity of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of these cells was confirmed by alizarin red, oil red and toluidine blue staining, respectively, confirming that the cells isolated for this study behave as MSC, as proposed by the International Society for Stem Cell Research. Hepatogenic differentiation was evaluated by analysis of cell morphology, capacity to store glycogen confirmed by PAS (periodic acid-Schiff), albumin synthesis confirmed by immunofluorescence, as well as hepatic-specific gene expression verified by real time PCR assays. Based on the published literature on hepatic differentiation, several protocols of one, two, and three steps were tested. Human MSC differentiated solely when treated in a three step-protocol, showing the ability to produce and store glycogen and synthesize albumin; however the expression of hepatic-specific genes such as albumin, α -fetoprotein and c-Met was not increased. An endoderm differentiation stage, added to the hepatic differentiation protocol,

increased the capacity to produce and store glycogen of differentiated MSC. In order to standardize the model of liver fibrosis induced by DMN, dose-response experiments were performed and the effect of hepatectomy in mixed models DMN/hepatectomy was observed. Severity of liver injury and the effect of cell transplantation were evaluated by macroscopic analysis of the livers, histology of liver biopsies stained with HE and Masson's trichrome, and evaluation of serum biochemical parameters. The macroscopic and histological observations, and altered alkaline phosphatase serum levels indicated the success in inducing liver fibrosis in DMN-treated rats at a dose of 10 µg/g of animal weight for three consecutive days, during four weeks, without any additional effect upon hepatectomy. Transplanting 1×10^7 umbilical cord MSC in the model of liver injury induced by DMN did not result in improvement of the fibrosis, decrease of alkaline phosphatase serum levels, or in weight gain of the treated animals compared to animals treated with PBSA after liver injury (placebo group). Together, these results suggest that human MSC are capable of differentiating to hepatocyte-like cells after more complex protocols, where hepatogenic inducers are sequentially added to the medium in order to mimic signaling that occurs during fetal development. Transplantation of undifferentiated umbilical cord MSC did not have any positive effect in a preclinical liver injury model characterized by an early stage of fibrosis. Supported by CNPq (573578/2008-7) and FAPESP (2007/54260-2).

Keywords: Mesenchymal stem cells, hepatogenic differentiation, cell therapy, liver fibrosis, dimethylnitrosamine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	α -fetoproteína
ALB	Albumina
ALT	Alanina transaminase
AST	Aspartato transaminase
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
BT	Bilirrubina total
CD	Cluster de diferenciação
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CK	Citoqueratina
c-Met	Receptor de HGF
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMN	Dimetilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
FA	Fosfatase alcalina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
HepG2	Linhagem celular isolada de hepatocarcinoma humano
HG-DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dubelco com alta glicose
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
IMDM	Modificação de Iscove do meio de Eagle
ITS	Insulina, transferrina e selenito de sódio
LG-DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dubelco com baixa glicose
MEC	Matriz extracelular
MOH	Medula óssea humana
MOR	Medula óssea de rato
OSM	Oncostatina M
PBSA	Solução de tampão fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+}
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (Reverse transcription polymerase chain reaction)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

pH	Potencial hidrogeniônico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RPMI	Meio Instituto Memorial Roswell Park
SCUH	Sangue de cordão umbilical humano
SFB	Soro fetal bovino
SRC	Soro de rato controle
SRH	Soro de rato hepatectomizado
TGF	Fator de transformação de crescimento
VCUH	Veia de cordão umbilical humano

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	17
1.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
1.2 – CÉLULAS-TRONCO: BIOLOGIA, CONCEITOS E CARACTERÍSTICAS	21
1.3 – MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE HEPÁTICA	25
1.4 – ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE HEPATÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	29
1.5 – MODELOS ANIMAIS DE FIBROSE E CIRROSE HEPÁTICA	33
2 – OBJETIVOS GERAIS	37
2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 – CÉLULAS E CULTURAS CELULARES	38
3.2 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DA PAREDE DA VEIA UMBILICAL	39
3.3 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL	39
3.4 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE RATO	40
3.5 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA HUMANA	41
3.6 – CITOMETRIA DE FLUXO	42
3.7 – DIFERENCIAÇÃO MULTILINHAGEM DE CTM	42
3.8 – COLORAÇÕES DE VERMELHO DE ALIZARINA, <i>OIL RED</i> E AZUL DE TOLUIDINA	44
3.9 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM	45
3.10 – DETECÇÃO DE GLICOGÊNIO	49
3.11 – IMUNOFLOURESCÊNCIA	49
3.12 – PCR EM TEMPO REAL	50

3.13 – MODELO ANIMAL DE FIBROSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIMETILNITROSAMINA	52
3.14 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 – VALIDAÇÃO DAS CTM UTILIZADAS NESTE ESTUDO	58
4.2 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM	67
4.2.1 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM UTILIZANDO PROTOCOLOS DE UM E DOIS PASSOS	68
4.2.2 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM UTILIZANDO PROTOCOLOS DE TRÊS PASSOS	77
4.3 – PADRONIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR DMN E TRANSPLANTE DE CTM DE VCUH	93
5 – CONCLUSÕES	106
6 – BIBLIOGRAFIA	107

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1: Sinalização responsável pela indução dos genes hepáticos a partir da endoderme.....	28
FIGURA 2: Observações morfológicas e análise funcional de CTM durante a diferenciação hepática.....	32
FIGURA 3: Alterações celulares e da matriz extracelular na fibrose hepática	34
FIGURA 4: Oxidação de DMN pelas enzimas do citocromo P450 2A6 e 2E1 e formação de formaldeído e alquildiazoidróxido	36
FIGURA 5: Representação esquemática dos diferentes protocolos utilizados para diferenciação hepatogênica	48
FIGURA 6: Representação esquemática do delineamento experimental de indução de fibrose hepática e transplante de CTM	57
FIGURA 7: Características morfológicas de CTM provenientes de fontes variadas.....	63
FIGURA 8: Gráficos das análises por citometria de fluxo de CTM humanas	64
FIGURA 9: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação osteogênica e adipogênica	65
FIGURA 10: Colorações com vermelho de alizarina e <i>oil red</i> de CTM de MOR	66
FIGURA 11: Coloração com azul de toluidina de CTM humanas	66
FIGURA 12: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica por diferentes protocolos	73
FIGURA 13: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica	74
FIGURA 14: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica	75
FIGURA 15: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica	76
FIGURA 16: Observações morfológicas de CTM de MOH após diferenciação hepática	

pelo método 6	88
FIGURA 17: Observações morfológicas de CTM de MOH após diferenciação hepática pelo método 7	89
FIGURA 18: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOH após 14* e 21* dias de diferenciação hepatogênica pelos métodos 6 e 7	90
FIGURA 19: Análise da expressão de albumina por imunofluorescência após a diferenciação hepática de CTM de MOH pelos métodos 6 e 7	91
FIGURA 20: Análise da expressão gênica de APP, cMet e ALB por PCR em tempo real durante a diferenciação hepática de CTM de MOH pelos métodos 6 e 7	92
FIGURA 21: Análise macroscópica do fígado de ratos Wistar controle e tratados com DMN	101
FIGURA 22: Análise histológica por coloração por HE do fígado de ratos tratados com DMN	102
FIGURA 23: Análise histológica por coloração por tricromo de Masson do fígado de ratos tratados com DMN	103
FIGURA 24: Parâmetros bioquímicos dos ratos tratados com DMN	104
FIGURA 25: Análises do transplante com CTM de VCUH	105
TABELA 1: Oligonucleotídeos usados para as análises de PCR em tempo real	51

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O fígado é o maior órgão interno do corpo e encontra-se situado na cavidade abdominal. O parênquima hepático, organizado em lóbulos, é composto pelas células epiteliais (hepatócitos), células endoteliais e células não parenquimais que incluem as células estreladas e as células de Kupffer. Esse órgão possui uma circulação sanguínea característica, pois recebe considerável volume de sangue venoso, ao contrário dos demais órgãos que recebem somente sangue arterial. Entre cada lóbulo, existe uma área chamada de espaço porta. Em cada um deles existe um ramo da artéria hepática, um ducto que se liga ao ducto biliar e vasos linfáticos, além de um ramo da veia porta.

Cerca de 70% do sangue recebido pelo fígado é venoso transportado pela veia porta, trazendo todo o material absorvido nos intestinos. Diversas funções cruciais são efetuadas pelo fígado, realizadas, principalmente, pelos hepatócitos. Tais funções incluem a produção da bile e de proteínas séricas como os fatores de coagulação, a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, a detoxificação dos produtos gerados na metabolização do álcool e drogas e a detoxificação da amônia, um produto do metabolismo do nitrogênio (Junqueira and Carneiro, 2008). A realização dessas funções é dependente da arquitetura hepática. O sinusóide, a unidade microvascular hepática, se mantém separado dos hepatócitos pelo espaço de Disse onde residem as células estreladas, delimitado por uma linha fenestrada de células endoteliais. O sangue venoso que chega ao fígado pela veia porta atravessa esse órgão através dos sinusóides em direção à veia central. Enquanto realiza esse trajeto, os poros entre as células endoteliais permitem as trocas metabólicas entre a corrente sanguínea e os hepatócitos. As células estreladas são células quiescentes

estocadoras de vitamina A e são as responsáveis pela síntese da matriz extracelular (MEC) no espaço de Disse. Nesta MEC, em uma forma latente, é incorporada uma gama de fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (MMP). Assim, a MEC regula a atividade celular e a disponibilidade de fatores de crescimento, sendo responsável por manter o estado diferenciado dos hepatócitos. Em condições de injúria hepática, as células estreladas são ativadas para uma forma proliferativa e produtora de MEC. A MEC produzida nas situações patológicas possui diferenças quantitativas e qualitativas em relação à MEC de um indivíduo normal. Desse modo, o excesso de MEC cria um impedimento físico para o fluxo metabólico bidirecional entre o sangue e os hepatócitos, levando a uma alteração da função hepática (Hernandez-Gea e Friedman, 2011).

Pacientes com insuficiência hepática aguda ou doença crônica, caracterizados pela perda maciça da função hepática, são considerados doentes críticos e habitualmente manejados em ambientes de terapia intensiva porque frequentemente progridem com encefalopatia, coma e morte (Sheil, 2002). Quando a insuficiência é reversível, o transplante hepático total ou de uma porção do fígado é um tratamento eficaz, porém de alto risco e custo, além de obrigar o uso de imunossupressores, por toda a vida, pela maioria dos pacientes. Em 2012, foram realizados 1.595 transplantes de fígado no Brasil e, desse total, 586 transplantes foram realizados no Estado de São Paulo (www.abto.gov.br). No entanto, apesar do considerável progresso, a demanda por fígados para transplante é sempre maior que a disponibilidade de doadores de órgãos. A lista de pacientes à espera pelo transplante de fígado gera significativa morbidade e mortalidade, sendo este um problema mundial (Fox e Roy-Chowdhury, 2004; Galvao et al., 2006; Mitry et al., 2002). Na tentativa de minimizar o problema da lista de espera pelo transplante de fígado, o Governo Brasileiro, adotou

em 2006, o MELD (do inglês *Model for End-stage Liver Disease*), um sistema de alocação dos fígados que leva em consideração a gravidade da doença hepática determinada pelos níveis séricos de bilirrubina e creatinina e pelo INR (do inglês *International Normalized Ratio for the Prothrombin Time*), e que gera um valor que varia entre 3 e 40. Quando acima de 15, o paciente entra para fila de transplante hepático. O sistema MELD, implantado nos Estados Unidos em 2002 (Moylan *et al.*, 2008) e na Europa em 2006 (Quante *et al.*, 2012), tem trazido resultados positivos na lista de espera por um fígado. No Brasil, após implementação do MELD, houve uma diminuição na taxa de mortalidade e no tempo de espera por um transplante hepático (Salvalaggio *et al.*, 2012), mas ainda, cerca de 20% dos pacientes morrem enquanto aguardam na fila de transplantes, ressaltando a necessidade de terapias inovadoras.

Na busca mundial pela melhora de qualidade de vida dos pacientes na fila de espera pelo transplante hepático, as terapias baseadas em células têm surgido como um potencial tratamento para uma variedade de doenças hepáticas, nas quais hepatócitos saudáveis são utilizados para restaurar, manter ou melhorar as funções do fígado doente (Fox e Roy-Chowdhury, 2004; Galvao *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012b). Na insuficiência hepática aguda, a terapia celular poderia ser usada como um tratamento temporário tipo “ponte”, melhorando as condições clínicas do paciente até que um órgão compatível esteja disponível ou até mesmo permitindo a regeneração hepática, descartando, assim, a necessidade do transplante de fígado (Demetriou *et al.*, 2004; Viswanathan e Gupta, 2012). Essa mesma terapia “ponte” poderia ser usada nas complicações agudas das doenças hepáticas crônicas (Lorenzini *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2012b). Nas doenças metabólicas do fígado hereditárias, caracterizadas pela deficiência de uma única enzima hepática ou proteína, mas com a realização normal das demais funções hepáticas, a terapia celular serviria inclusive

como uma terapia gênica, levando à cura dos pacientes por reposição do gene funcional (Bruzzone e Strom, 2006; Fox et al., 1998; Grompe, 2006; Jorns et al., 2012).

Outras vantagens da terapia celular incluem o fato dos hepatócitos poderem ser preservados em bancos celulares e disponibilizados em situações de urgência, além da suspensão celular, de menor massa, ser potencialmente menos imunogênica que o órgão sólido inteiro (Grompe, 2006).

O tratamento das doenças hepáticas com terapias baseadas em células vem sendo proposto desde a década de 60 e sua utilização clínica foi primeiro relatada, na forma de um fígado bioartificial na década de 80, e alguns anos depois, através do transplante de hepatócitos (Yu *et al.*, 2012b). No transplante de células, há ainda a possibilidade de encapsulamento celular, que permitiria o transplante de hepatócitos alogênicos sem a necessidade de imunossupressão (Aoki *et al.*, 2005).

Apesar das décadas de pesquisas, a terapia celular ainda é um procedimento experimental e tem sua aplicação, como uma rotina médica no tratamento de doenças hepáticas, limitada pela dificuldade de se obter hepatócitos humanos isolados (Fox e Roy-Chowdhury, 2004; Galvao et al., 2006; Puppi et al., 2012; Tritto et al., 2012). Primeiramente, a coleta de hepatócitos compete com a mesma fonte dos órgãos para transplante, um procedimento autorizado e padronizado. Além disso, quando removidos da arquitetura complexa do fígado, essas células rapidamente perdem a expressão de genes específicos do fígado e se tornam fenotipicamente instáveis em cultura. Na tentativa de superar essa barreira, investigações têm sido feitas com o intuito de identificar fontes alternativas ao uso de hepatócitos humanos isolados (Bruzzone e Strom, 2006; Puppi et al., 2012). A obtenção de grandes quantidades de hepatócitos humanos a partir de células-tronco é considerada uma opção promissora

(Dalgetty et al., 2009; Russo e Parola, 2012), capaz de resolver o problema da escassez de hepatócitos isolados. Células-tronco, autólogas ou até mesmo alogênicas, podem ser expandidas *in vitro* e teoricamente repopular o fígado com hepatócitos e a correspondente atividade metabólica, por períodos mais longos, devido à possibilidade de geração contínua de novos hepatócitos (Sancho-Bru et al., 2009).

1.2 – CÉLULAS-TRONCO: BIOLOGIA, CONCEITOS E CARACTERÍSTICAS.

A produção e a manutenção de todas as linhagens celulares de um organismo adulto são dependentes de uma cadeia de processos altamente regulados envolvendo a proliferação, migração, diferenciação e maturação celular. O tipo celular presente na base dessa cadeia tem sido chamado de célula-tronco, pois tem a capacidade única de se dividir para manter a população de células não especializadas, podendo também se diferenciar em tipos celulares especializados (Minguell et al., 2001). Existem duas categorias principais de células-tronco, as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas. Células-tronco embrionárias, definidas pela sua origem, são isoladas da massa celular interna no estágio de blastocisto do desenvolvimento embrionário. Essas células são pluripotentes e originam as três camadas germinativas: mesoderme, endoderme e ectoderme, das quais todas as células de um organismo derivam (Rossant, 2001). As células-tronco embrionárias são consideradas as mais versáteis para a aplicação na medicina regenerativa. Takahashi e Yamanaka desenvolveram um protocolo, onde células somáticas foram reprogramadas para um estado de pluripotência por introdução, via infecção retroviral, dos fatores de transcrição Oct3/4, Sox2, cMyc e Klf4, responsáveis pela manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias (Takahashi e

Yamanaka, 2006). Essas células foram denominadas células-tronco de pluripotência induzida, iPS (do inglês *induced pluripotent stem cell*). Elas exibem morfologia, expressão de genes envolvidos na pluripotência e propriedades de crescimento similares às das células-tronco embrionárias e, quando transplantadas subcutaneamente em camundongos *nude*, induzem o aparecimento de tumores contendo células das três camadas germinativas, ou seja, são capazes de formar teratomas. Assim, não só há problemas éticos em torno da utilização de células-tronco embrionárias e das iPS, como há a falta de entendimento sobre como especificamente regular a sua diferenciação e evitar a formação de tumores malignos. Relatos sobre a formação desses tumores a partir de células-tronco embrionárias, em modelos experimentais, têm levado os pesquisadores a desenvolverem e utilizarem células-tronco adultas, onde essas barreiras parecem ser mais facilmente contornáveis (Salem e Thiemermann, 2010). Células-tronco adultas são células indiferenciadas, isoladas a partir dos tecidos do organismo, que possuem capacidade de autorenovação e de geração de células precursoras ou progenitoras. Estas células se diferenciam em células especializadas com morfologia e funções típicas dos tecidos onde se localizam (Kassem et al., 2004; Li e Ikehara, 2013), funcionando como fonte de células para a substituição e regeneração durante o *turnover* celular normal, para o reparo após uma injúria tecidual (Bunnell et al., 2010) ou para a reposição frente à falha progressiva de tecidos e órgãos associados com o avanço da idade biológica (Kassem, 2006). O primeiro relato acerca do isolamento de células-tronco adultas a partir da medula óssea ocorreu na década de 70. Essas células possuíam morfologia fusiforme semelhante a fibroblastos e capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro*. Na ocasião foram denominadas células formadoras de colônias tipo fibroblasto, as CFU-F (do inglês

Colony-forming unit-fibroblasts) (Friedenstein et al., 1970). O termo, célula-tronco mesenquimal (CTM), foi primeiro utilizado por Caplan (Caplan, 1991). Desde então, o crescente interesse de investigadores por novas fontes de CTM, se encontra refletido nos diferentes métodos de isolamento e expansão dessas células a partir de fontes variadas, incluindo, tecido adiposo (Ong e Sugii, 2013; Yang et al., 2011), folículo capilar (Yu et al., 2006), sangue menstrual (Rossignoli et al., 2013), sangue e veia de cordão umbilical (Sibov et al., 2012; Simoes et al., 2013), pâncreas (Seeberger et al., 2011), fígado (Schmelzer et al., 2007), placenta (Vellasamy et al., 2012) e polpa dentária (Ranganathan e Lakshminarayanan, 2012). As técnicas empregadas nos diversos protocolos diferem quanto ao meio de cultivo utilizado, nos fatores de crescimento e outras moléculas adicionadas como suplementos, na densidade na qual as células são plaqueadas após o isolamento e subcultivo, no tempo de expansão após o isolamento, na taxa de confluência em que são subcultivadas e na data da primeira troca de meio, que varia entre 24 horas e sete dias após o isolamento. Essas diferenças podem modificar os marcadores de superfície e a funcionalidade de CTM provenientes de diferentes laboratórios, influenciando, assim, a capacidade de expansão e diferenciação e as propriedades imunogênicas. Além disso, culturas primárias de CTM são heterogêneas, apresentando contaminantes celulares que variam de acordo com a fonte de isolamento.

Essa enorme variedade de fontes e de metodologias de obtenção e manutenção das CTM torna difícil a comparação das propriedades biológicas e dos dados experimentais gerados pelos diferentes laboratórios (Sancho-Bru et al., 2009). Estabelecer o quão similares são as células isoladas por diferentes grupos de pesquisa é uma questão importante no contexto da terapia celular. Para a resolução deste problema, a Sociedade Internacional de Pesquisa em Células-tronco propôs,

em 2006, um conjunto de critérios mínimos para a identificação de CTM, que incluem: a aderência ao plástico, uma propriedade bem descrita dessas células; a expressão de um conjunto específico de marcadores de superfície celular e a capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Dominici *et al.*, 2006). Quanto aos marcadores de superfície celular medidos por citometria de fluxo, as CTM devem ser positivas para CD (*cluster of differentiation*) 105, CD73 e CD90 (conhecidos, respectivamente, como endoglina, nucleotidase 5' e Thy-1) e negativas para os marcadores CD45, CD34, CD31, CD11b e CD19 (que marcam respectivamente, leucócitos, células endoteliais, progenitores hematopoiéticos primitivos, monócitos e macrófagos e linfócitos B) e HLA-DR (células apresentadoras de antígeno, em geral monócitos/macrófagos e células dendríticas). A capacidade de diferenciação das CTM pode ser demonstrada por técnicas padronizadas de coloração de células em cultura. A diferenciação, em osteoblastos é demonstrada com vermelho de alizarina ou coloração de Von Kossa, em adipócitos é demonstrada com *oil red* e em condrócitos é demonstrada com azul de toluidina, *alcian blue* ou com a imunohistoquímica para colágeno do tipo II.

Inicialmente, acreditava-se que as CTM tinham capacidade de diferenciação limitada aos tipos celulares da linhagem mesenquimal, denominadas assim, multipotentes. Pesquisas nesta área têm mostrado que além de sua capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, essas células possuem, pelo menos *in vitro*, a capacidade de diferenciar em outros tipos celulares de origem endodérmica e ectodérmica, incluindo células similares a hepatócitos, neurônios e células produtoras de insulina (Jiang *et al.*, 2002). Essa habilidade das CTM de um tecido (mesênquima) gerar células especializadas de outros tecidos foi recentemente denominada de plasticidade de células-tronco adultas (Banas *et al.*, 2007; Wagers e

Weissman, 2004; Watt e Hogan, 2000) e gerou grande expectativa na área da medicina regenerativa hepática pela promessa da existência de uma fonte teoricamente ilimitada de hepatócitos.

A diferenciação *in vitro* de CTM, mais especificamente em hepatócitos, é dependente de um microambiente, estabelecido em cultura, contendo fatores de crescimento e moléculas cuja formulação resultou de anos da pesquisa em desenvolvimento embrionário do fígado, baseada no uso combinado de manipulação genética em camundongos e de técnicas avançadas de isolamento e cultivo celular.

1.3 – MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE HEPÁTICA

Durante a embriogênese de mamíferos, diferentes segmentos do intestino (endoderme) dão origem aos órgãos respiratórios e digestivos associados que incluem o fígado, os pulmões, o pâncreas, a tireóide e o trato gastrointestinal. Tipicamente, uma porção da endoderme começa a expressar genes específicos de um desses tecidos e as células especializadas recém-formadas proliferam, saindo da camada endodérmica para formar um broto tecidual e iniciando a morfogênese (Hata *et al.*, 2007). No caso do fígado, a mesoderme cardíaca e o septo transversal liberam sinais que induzem a proliferação das células da porção ventral da endoderme que começam a invadir o mesênquima do septo transversal circundante na forma de placas de hepatoblastos bipotenciais. Estes, posteriormente, irão gerar os hepatócitos e os colangiócitos. Para isso, forma-se o broto hepático, dando início à formação do fígado (Nakamura e Nishina, 2009) (Figura 1). Durante a vida fetal, o fígado é o órgão responsável pela hematopoese. No período próximo ao nascimento, são as células hematopoéticas que secretam os sinais que levam os hepatócitos a produzirem as enzimas metabólicas características do órgão, que controlam os níveis de metabólitos

e proteínas séricas no sangue, o estoque de glicogênio e os processos de detoxificação (Zaret, 2000).

A reconstituição *in vitro* da especificação hepática tem revelado que o mesoderma cardíaco libera FGF (fator de crescimento de fibroblasto) 1, 2 e 8 levando à formação do broto hepático a partir da endoderme intestinal (Jung *et al.*, 1999). A ação de FGF1 e FGF2 tem-se mostrado dose-dependente, com baixas, médias e altas doses especificando a formação de pâncreas, fígado e pulmão, respectivamente (Serls *et al.*, 2005; Shifley *et al.*, 2012). Simultaneamente à produção de FGFs pela mesoderme cardíaca, ocorre a secreção de BMP (*bone morphogenetic protein*) 2 e BMP4 pelo septo transversal que leva à expressão de genes hepato-específicos pelas células da endoderme ventral e migração dessas células para o mesênquima circundante, resultando na formação do broto hepático (Rossi *et al.*, 2001). Desse modo, a especificação hepática a partir da endoderme está sob a influência da sinalização simultânea de FGFs e BMPs secretados pela mesoderme cardíaca e septo transversal, respectivamente.

Kamiya e colaboradores desenvolveram um sistema de cultura de hepatócitos fetais murinos para investigar os fatores requeridos para o desenvolvimento de hepatócitos (Kamiya *et al.*, 1999). Neste trabalho, mostraram que a oncostatina M (OSM), uma citocina da família da interleucina-6 (IL-6), em combinação com o glicocorticóide sintético dexametasona, induz a maturação dos hepatócitos. Além disso, o fígado de camundongos deficientes para uma subunidade do receptor de OSM falhou no processo de maturação de hepatócitos. Mostraram ainda que, durante a organogênese hepática, a OSM é produzida por células hematopoiéticas CD45⁺ enquanto seu receptor é predominantemente expresso em hepatócitos, sugerindo um

mecanismo parácrino, onde células do sangue sofrem expansão temporária no fígado fetal para produzirem a OSM e promover o desenvolvimento de hepatócitos *in vivo*.

Já foi mostrado que enquanto HGF (fator de crescimento de hepatócito) é produzido pelas células endoteliais do sinusóide hepático de origem mesenquimal, cMet, o receptor de HGF, é produzido pelos hepatócitos (Schmidt *et al.*, 1995). Utilizando embriões de camundongos mutantes que não produzem HGF, os autores relataram a falha em completar o desenvolvimento do animal, incluindo o desenvolvimento anormal do fígado, o qual é reduzido em tamanho, com perda extensa dos hepatócitos. Esses animais morrem ainda no útero.

Não são só os estudos de embriogênese que provêm informações sobre as moléculas envolvidas na diferenciação hepática de células-tronco. Recentemente foi mostrado que, em camundongos submetidos a um modelo agudo de injúria hepática, CTM da medula óssea (MO) são mobilizadas para a circulação sanguínea, migrando para o foco da injúria em resposta aos sinais liberados pelo fígado doente, e alguns parecem se diferenciar em hepatócitos (Chen *et al.*, 2010). Com o objetivo de identificar as moléculas envolvidas na diferenciação hepática de CTM no modelo agudo, outros autores isolaram e cultivaram hepatócitos de camundongos após a indução de insuficiência hepática grave com tetracloreto de carbono, recolhendo o meio da cultura após 48 horas para ser utilizado como indutor da diferenciação hepática de CTM de MO (Dong *et al.*, 2010). Quando FGF4, HGF e OSM foram retirados, com o auxílio de anticorpos específicos, deste meio condicionado, o potencial para diferenciação foi drasticamente diminuído. Ficou claro também, que FGF4 e HGF são essenciais para a iniciação da diferenciação hepática, enquanto que OSM é crucial para a maturação de hepatócitos.

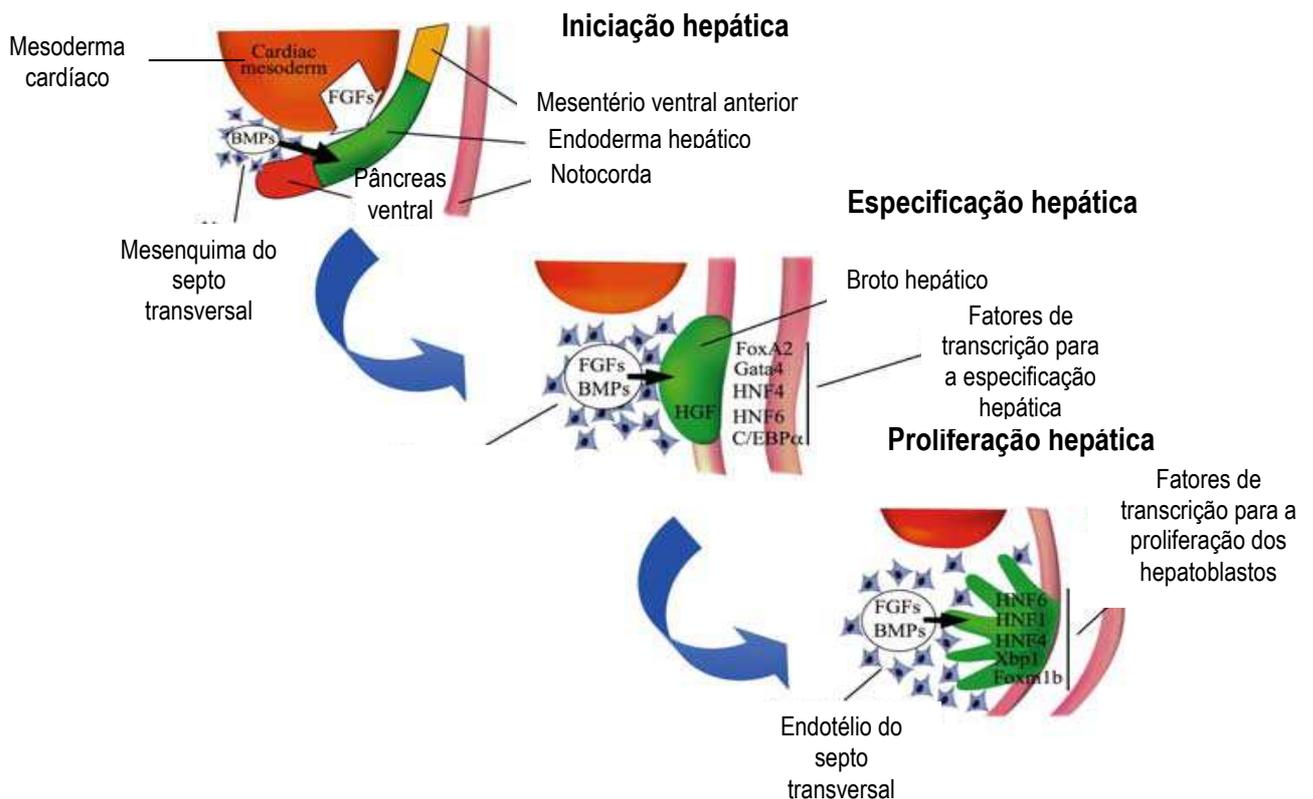


FIGURA 1: Sinalização responsável pela indução dos genes hepáticos a partir da endoderme. A figura mostra a localização do mesoderma cardíaco e das células do septo transversal que liberam os fatores de transcrição que promovem a indução hepática. Figura retirada de (Navarro-Alvarez et al., 2010).

FGFs, BMPs, OSM, HGF e glicocorticóides são sinais extracelulares que, quando se ligam a seus receptores transmembranários e citoplasmáticos no caso dos glicocorticóides, presentes em células responsivas, desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que regula o nível dos fatores de transcrição específicos envolvidos na diferenciação celular. Estudos da diferenciação hepática têm apontado que os fatores de transcrição HNF1 α e β , FoxA (HNF3), HNF4 α , HNF6, GATA4 e c/EBP α agem em conjunto para controlar a expressão do repertório completo de proteínas que definem a função hepática (Costa et al., 2003; Li et al., 2000; Zhao e Duncan, 2005).

Embora ainda existam lacunas, o conhecimento gerado até o momento tem sido a base para o aperfeiçoamento dos protocolos para a diferenciação de células-tronco em hepatócitos.

1.4 – ESTRATÉGIAS PARA OBTENÇÃO DE HEPATÓCITOS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Relatos na literatura mostram que, em certas condições de cultura, CTM provenientes de diversas fontes podem diferenciar em células similares a hepatócitos (Wu e Tao, 2012; Zhang et al., 2013).

De forma geral, os protocolos utilizados para se alcançar a diferenciação hepática *in vitro* a partir de CTM são divididos em três tipos, conforme o número de etapas: uma ou duas ou três, que buscam reproduzir as etapas da embriogênese do tecido hepático. Nos protocolos de uma etapa, as CTM são frequentemente cultivadas em meio contendo HGF (Wang *et al.*, 2004), HGF e FGFs (Kang *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009) ou HGF e OSM (Seo *et al.*, 2005), durante o período de diferenciação que normalmente dura três semanas. Já nos protocolos de duas etapas, o primeiro passo, ou seja, a etapa de diferenciação varia em diferentes protocolos e as CTM são cultivadas em meio contendo somente um indutor hepático ou uma combinação de indutores que incluem HGF e FGFs. No segundo passo, na etapa de maturação, ocorre pouca variação entre os protocolos e as CTM são normalmente cultivadas em meio contendo OSM e dexametasona (Hong *et al.*, 2005; Lysy *et al.*, 2007; Ong *et al.*, 2006). Aos protocolos de duas etapas pode ser adicionada uma fase inicial, antes da etapa de diferenciação, denominada fase de comprometimento ou de sincronização celular onde as células são cultivadas por dois dias em meio sem SFB (soro fetal bovino) e suplementado com EGF (fator de crescimento epidermal) e FGF2

(Lee *et al.*, 2004b; Lue *et al.*, 2010; Talens-Visconti *et al.*, 2006), gerando um protocolo de três etapas. Com frequência, outras citocinas e fatores de crescimento são adicionados a esses protocolos básicos com o intuito de aumentar na cultura, a porcentagem de células diferenciadas.

Por outro lado, os protocolos para diferenciação hepática a partir de células-tronco embrionárias possuem um passo inicial, onde essas células são cultivadas na presença de activina A, para indução da endoderme (Hay *et al.*, 2008; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Seguido esse passo, as células são cultivadas em meio para indução da diferenciação hepática como descrito acima para as CTM (Hay *et al.*, 2008; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Recentemente, essa etapa de diferenciação endodérmica foi adicionada como fase inicial em protocolos de dois passos para a diferenciação hepática de CTM gerando um protocolo de três etapas (Lee *et al.*, 2012; Waclawczyk *et al.*, 2010).

A cultura de células em monocamada é a técnica de cultura comumente aplicada para diferenciação *in vitro* de CTM em hepatócitos. Porém, outros sistemas de cultura têm sido empregados para tal finalidade. Quando CTM foram cocultivadas com células hepáticas fetais (Lange *et al.*, 2006) e com biópsias de fígado fibrótico (Ong *et al.*, 2006) e submetidas ao protocolo de diferenciação hepática, apresentaram maior capacidade de diferenciação comparadas às CTM em monocultura, submetidas aos mesmos protocolos de diferenciação hepática. Em adição, os sistemas de cultura 3D, onde os fígados de rato são decelularizados para obtenção de uma estrutura que mimetize o fígado nativo, parecem promover a diferenciação de CTM em hepatócitos (Ji *et al.*, 2012). As CTM, injetadas nesta estrutura, submersas em meio suplementado com indutores para diferenciação hepática, apresentaram maior grau de diferenciação quando comparadas às CTM diferenciadas em sistema de cultura tradicional (Ji *et al.*, 2012).

Os hepatócitos obtidos a partir da diferenciação de células-tronco são, com frequência, denominados células similares a hepatócitos por serem parcialmente caracterizados e apresentarem apenas parte das características de hepatócitos maduros. Os critérios para identificar uma célula diferenciada como sendo um hepatócito ainda não estão claramente padronizados e diferem enormemente nos vários estudos (Sancho-Bru *et al.*, 2009). Porém, essa é uma etapa crucial e geralmente inclui caracterização morfológica, fenotípica e funcional, demonstrada através de diferentes técnicas laboratoriais (Wu e Tao, 2012). Sob a observação microscópica, células similares a hepatócitos adquirem morfologia arredondada, poligonal ou cuboide (Figuras 2A, B e C) (Ayatollahi *et al.*, 2011). A caracterização fenotípica pela expressão de albumina (ALB), citoqueratina (CK) 18, α -fetoproteína (AFP), c-Met, HNF1- α , HNF4, PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase) e TAT (tirosina aminotransferase) é geralmente medida por imunofluorescência e RT-PCR (Hong *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 2002; Snykers *et al.*, 2007). Para caracterização funcional, é verificada a capacidade das células diferenciadas em produzir e estocar glicogênio, mensurada pela oxidação do ácido periódico e reação de Schiff (PAS) (Figuras 2D e E) e pela sua capacidade de secretar uréia e ALB (Chivu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2004b).

A próxima etapa nos ensaios corresponde à comprovação *in vivo* da funcionalidade das células similares a hepatócitos, obtidas *in vitro*. Além disso, finalização da diferenciação hepática de CTM pode ocorrer *in vivo*, após o transplante dessas células, como proposto em modelos experimentais de injúria hepática (Seo *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2012a). Não menos importante, a transferência de uma fase pré-clínica para uma rotina clínica da terapia celular é dependente dos modelos experimentais de injúria hepática.

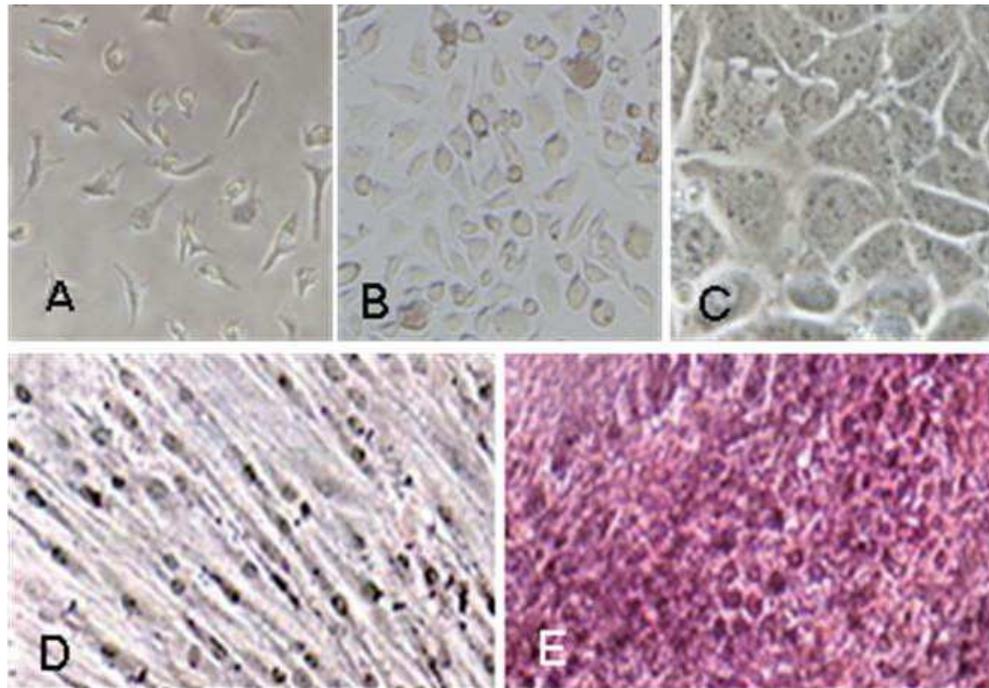


FIGURA 2: Observações morfológicas e análise funcional de CTM durante a diferenciação hepática. **(A)** CTM mostram retração das projeções citoplasmáticas no 8° dia após indução hepática. **(B)** No 14° dia CTM apresentam morfologia cuboide. **(C)** No 20° dia, a maioria das CTM tratadas exibe morfologia de células similares a hepatócitos com presença de estruturas intracelulares. A coloração de PAS mostra a incapacidade de CTM não diferenciadas de estocar glicogênio **(D)** e a capacidade de CTM diferenciadas de estocar glicogênio **(E)**. As figuras A, B e C foram retiradas de (Chen *et al.*, 2007) e as figuras D e E foram retiradas de (Lee *et al.*, 2012).

1.5 – MODELOS ANIMAIS DE FIBROSE E CIRROSE HEPÁTICA

Fibrose e cirrose hepática são as consequências frequentes de todas as doenças crônicas que afetam o fígado (Pinzani *et al.*, 2011) e estão associadas com estresse oxidativo, aumento de TGF- β 1 (fator de transformação de crescimento- β 1), morte de hepatócitos e inflamação crônica (Brenner, 2009). Após a lesão hepática, a morte de hepatócitos mobiliza linfócitos, plaquetas e macrófagos, que incluem as células de Kupffer, formando um infiltrado inflamatório que produz TGF- β 1, IL-1 β e PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), ativando as células estreladas do fígado (Friedman, 2003; Ramacheran e Iredale, 2012). Em adição à produção de TGF- β 1, essas células, juntamente com os hepatócitos, passam a ser fonte de

espécies reativas de oxigênio que também ativam as células estreladas (Friedman, 2008). Neste processo de ativação, as células estreladas do fígado são convertidas de uma forma quiescente estocadora de vitamina A para uma forma proliferativa produtora de matriz extracelular (MEC) (Figura 3) (Friedman, 2003). Este é o evento chave do processo, pois é o acúmulo de MEC que caracteriza a fibrose hepática (Forbes e Parola, 2011). Quando a lesão é aguda, as mudanças na arquitetura hepática são transitórias e sua composição normal é restaurada (Lee e Friedman, 2011). Porém, nos casos das doenças crônicas hepáticas, o dano contínuo leva ao estímulo constante do processo de regeneração hepatocelular, o acúmulo persistente de MEC e a progressiva substituição do parênquima hepático, resulta em cirrose (Friedman, 2008). Ao final, a cirrose hepática é caracterizada pela substituição generalizada da estrutura hepática normal por nódulos regenerativos circundados por fibrose (Lida *et al.*, 2005).

Modelos animais de fibrose e cirrose hepática são empregados para o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos tanto no próprio processo patológico como na regeneração hepática, além de serem necessários para avaliar a eficácia de novas terapias (Rahman e Hodgson, 2000).

Os métodos para indução de injúria hepática em animais experimentais incluem procedimentos cirúrgicos, uso de drogas hepatotóxicas ou uma combinação (Belanger e Butterworth, 2005). A repetição de um dano tóxico ao fígado é uma estratégia clássica para indução de fibrose e cirrose hepática em animais experimentais (Starkel e Leclercq, 2011). As principais drogas utilizadas para tal fim incluem D-galactosamina, tetracloreto de carbono (CCl₄), tioacetamida (TAA) e dimetilnitrosamina (DMN), entre outras, que são administradas por via oral ou por injeção intraperitoneal em diferentes concentrações e em aplicações que podem ser

únicas ou semanais com duração de meses (Passos *et al.*, 2011; Tunon *et al.*, 2009). Independentemente da droga utilizada, a fibrose e a cirrose hepática são, com frequência, avaliadas através da coloração de biópsias hepáticas por picrossírius ou tricromo de Masson, que coram proteínas da MEC permitindo a visualização dos septos fibróticos sob o microscópio (Shaker *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Em adição às técnicas histológicas, os níveis séricos de ALB, fosfatase alcalina (FA), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e bilirrubinas também são monitorados (Ansil *et al.*, 2011; Farjam *et al.*, 2012).

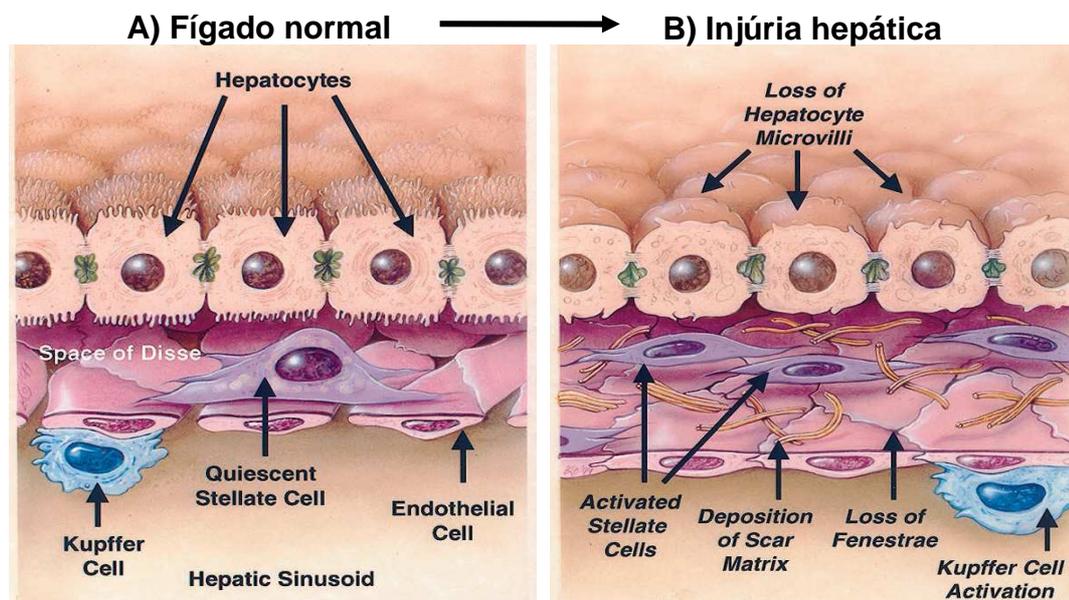


FIGURA 3: Alterações celulares e da MEC na fibrose hepática. A arquitetura hepática é composta pelas células epiteliais (hepatócitos), pelas células endoteliais que formam o sinusóide fenestrado, pelas células hepáticas esteladas e pelas células de Kupffer. **(A)** O sinusóide é separado dos hepatócitos por uma membrana basal denominada espaço de Disse, a qual permite as trocas metabólicas entre a corrente sanguínea e os hepatócitos. Após a lesão, as HSCs tornam-se ativas e passam a secretar grandes quantidades de MEC, **(B)** A deposição progressiva de MEC no espaço de Disse leva à perda das fenestrações do sinusóide e das microvilosidades dos hepatócitos, impedindo as trocas metabólicas bidirecionais (Hernandez-Gea e Friedman, 2011). Figura retirada de (Friedman, 2003).

No presente trabalho, escolhemos a DMN para estabelecer o modelo experimental para testar a capacidade regenerativa com o transplante de CTM. Este fármaco foi escolhido porque, além de poder ser empregado em ratos (Guo *et al.*, 2006), e em camundongos (Hu e Liu, 2006), apresenta menor toxicidade, quando comparado, por exemplo, ao CCl₄ e à D-galactosamina, podendo ser administrado por mais tempo e em maior número de doses, evitando a mortalidade expressiva comumente observada com as demais drogas nos animais experimentais (Jezequel *et al.*, 1989).

A DMN é uma molécula que faz parte do grupo de compostos orgânicos denominados nitrosaminas, que possuem fórmula estrutural R₁ R₂ N-N=O, onde R₁ e R₂ podem ser representados por um grupo alquila. No caso da DMN, R₁ e R₂ são, ambos, formados por um grupo metila (Dutra *et al.*, 2007). Após a ativação metabólica pelas enzimas do citocromo P450, CYP2E1 e CYP2A6, as nitrosaminas exercem ação carcinogênica (Kang *et al.*, 2007). Neste processo de biotransformação, a DMN é convertida em uma molécula de formaldeído e um grupo alquildiazoidróxido (Figura 3). Este último gera intermediários metabólicos que são agentes alquilantes de DNA, RNA e proteínas (Chowdhury *et al.*, 2010). Essa alquilação do DNA é a base do potencial da DMN para a formação de tumores (Chowdhury *et al.*, 2010). Quando injetada repetidamente e em pequenas doses, a DMN causa a necrose de hepatócitos e a subsequente fibrose hepática, caracterizada pela deposição de colágeno no espaço de Disse (George *et al.*, 2001; Jezequel *et al.*, 1987). Em resposta à necrose de hepatócitos, macrófagos migram da corrente sanguínea para as áreas de necrose, onde fagocitam os restos celulares para limpeza da área necrótica, gerando uma arquitetura hepática irregular (Jin *et al.*, 2003). Os mesmos macrófagos infiltrantes secretam as citocinas, que ativam as células estreladas do

fígado, instaurando o ciclo de injúria e regeneração, que culmina na remodelação do fígado e na fibrose (Guo *et al.*, 2006). Assim, o modelo animal induzido com DMN parece recapitular com maior fidelidade a história natural da fibrose e insuficiência hepática crônica em pacientes e foi escolhido para o teste funcional *in vivo*.

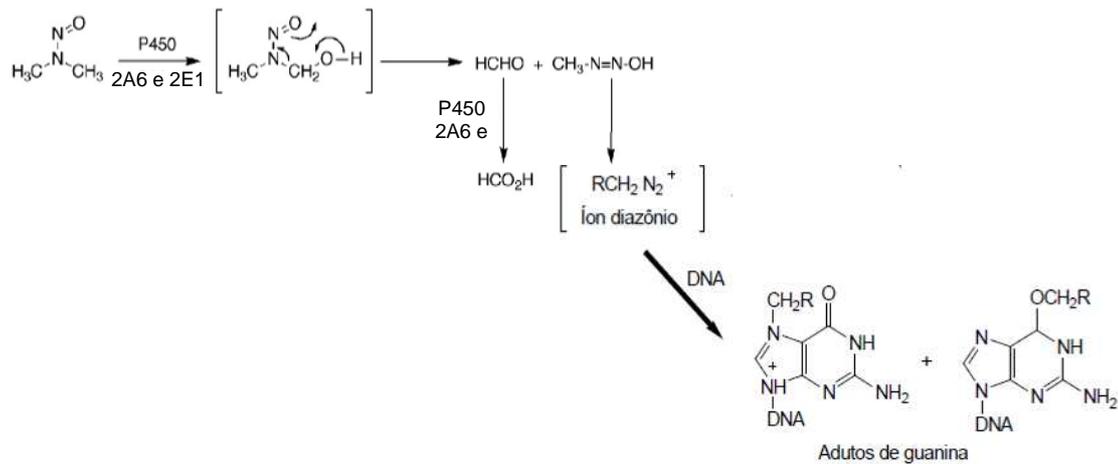


FIGURA 4: Oxidação de DMN pelas enzimas do citocromo P450 2A6 e 2E1 e formação de formaldeído e alquildiazoidróxido. Adaptado de (Chowdhury *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2007).

2 – OBJETIVOS GERAIS

Diferenciar células-tronco mesenquimais em hepatócitos e desenvolver um modelo pré-clínico de fibrose hepática para ensaios de terapia celular.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar CTM de diferentes fontes e caracterizá-las quanto à sua morfologia, seus marcadores de superfície celular e sua capacidade diferenciação multilinhagem para validação dessas células como CTM.

- Testar protocolos de um, dois e três passos para diferenciação hepática de CTM e identificar o melhor protocolo para ser utilizado na obtenção de células similares a hepatócitos.

- Verificar se a diferenciação endodérmica, prévia à diferenciação hepática, com tratamento com activina A aumenta a eficiência de diferenciação hepática.

- Implantar um modelo animal de fibrose hepática induzida por DMN para fins de ensaio pré-clínico de transplante celular de CTM diferenciadas ou não, para verificar se são capazes de normalizar os parâmetros histológicos e bioquímicos alterados pela doença.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CÉLULAS E CULTURAS CELULARES

As células foram cultivadas em frascos plásticos adequados para o cultivo celular, exceto quando especificado. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Estoques celulares foram congelados em meio contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e soro, e mantidos em reservatório contendo nitrogênio líquido.

Os antibióticos utilizados nos meios de cultura foram estreptomicina e ampicilina.

Linhagens comerciais de HepG2 (Linhagem celular isolada de hepatocarcinoma humano) foram cultivadas, rotineiramente, em meio DMEM suplementado com SFB 10% e antibióticos.

Células-tronco mesenquimais foram obtidas de medula óssea humana (MOH) e de rato e de sangue e veia de cordão umbilical humano e cultivadas em meio IMDM (Modificação de Iscove do meio de Eagle) (Hyclone) ou DMEM (Invitrogen) suplementado com SFB 10% e antibióticos.

Os meios utilizados sempre estavam suplementados com SFB 10% e antibióticos, quando o SFB foi suprimido ou quando outros suplementos foram adicionados esses foram citados no texto.

O subcultivo foi feito antes que as células atingissem 80% da confluência máxima do frasco de cultura, para evitar a perda de sua multipotência.

Os cordões umbilicais humanos foram disponibilizados, perante consentimento livre e esclarecido, nas dependências do Hospital Universitário - USP e do Hospital

Israelita Albert Einstein (HIAE), respectivamente, sob os processos número CEP/HU 767/07 e CEP/Einstein 09/1130.

Todas as fontes de células-tronco foram processadas em média três horas após a coleta.

3.2 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DA PAREDE DA VEIA UMBILICAL

Os cordões umbilicais foram processados o mais rápido possível (dentro de 1-3 horas), após o parto da parturiente, segundo protocolos baseados na literatura, com modificações baseadas na literatura mais recente (Hong *et al.*, 2005). A veia do cordão foi canulada em suas duas extremidades e lavada com meio RPMI (Meio Instituto Memorial Roswell Park). O vaso foi preenchido com solução de 0,1% colagenase tipo IA, em RPMI e incubado a 37°C por 20 minutos e massageado a cada 5 minutos para facilitar a digestão. A veia foi então lavada com RPMI e a suspensão de células endoteliais e subendoteliais foi coletada. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 600g e ressuspensas em IMDM. As células foram semeadas em frascos de cultura aderentes e mantidas em estufas à 37°C com 2% CO₂. Após 24h, o meio foi trocado e as células que não aderiram foram descartadas. Aproximadamente duas semanas após este processamento, começaram a aparecer colônias fibroblásticas, características de células-tronco mesenquimais.

3.3 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

Logo após a secção do cordão e quando o recém-nato já se encontrava aos cuidados do pediatra, o sangue foi colhido na extremidade do cordão umbilical que permanecia ligado à placenta e armazenado em um tubo heparinizado (25 U/mL) para posterior utilização. Todas as amostras foram processadas dentro de 1-3 horas após

o parto. O sangue foi diluído na proporção de 1:3 com solução de tampão fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBSA) heparinizada e carregado sobre um colchão de 15 mL de Ficoll-PaquePlus (Histopaque, GE Healthcare, $d=1.077$ g/mL) em tubos Falcon de 50 mL. Após a centrifugação à 800g por 30 minutos, as células mononucleadas foram recolhidas da interface e ressuspensas em RPMI. As células foram então centrifugadas mais uma vez a 600g por 15 minutos, ressuspensas em meio IMDM com antibióticos, semeadas em frascos de cultura aderentes e mantidas em estufas à 37°C com 2% CO_2 . Após 24h, o meio foi trocado e as células que não aderiram foram descartadas. Aproximadamente duas semanas após este processamento, começam a aparecer colônias fibroblastóides, características de células-tronco mesenquimais.

3.4 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO A PARTIR DA MEDULA ÓSSEA DE RATO

Ratos machos da linhagem Wistar com peso aproximado de 200g foram obtidos no Biotério do IQ-USP e utilizados para o isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. Foram utilizados seis ratos, por experimento de isolamento de células-tronco, os quais tiveram seus fêmures expostos e isolados com as extremidades intactas. Os ossos foram limpos com auxílio de bisturi cirúrgico para retirada de tecido envolto e armazenados em meio IMDM. Após o corte das epífises com auxílio de tesoura cirúrgica, a medula óssea foi coletada por meio de *flush* com meio IMDM utilizando uma seringa agulhada. A medula óssea recuperada de todos os ossos foi centrifugada a 200g por 15 minutos a temperatura ambiente e as células ressuspensas em 30 mL de meio RPMI. A suspensão celular foi carregada sobre um colchão de 15 mL de Ficoll-PaquePlus (Histopaque, GE Healthcare, $d=1.077$ g/mL) em tubos Falcon de 50 mL. Após a centrifugação a 800 g por 30 minutos, as células mononucleadas foram recolhidas da interface e ressuspensas em RPMI. As

células foram então centrifugadas por três vezes em RPMI a 200 g por 15 minutos. Após a última centrifugação as células foram ressuspensas em meio IMDM e semeadas em frascos de cultura aderentes e mantidas em estufas à 37°C com 2% CO₂. Após 24h, o meio foi trocado e as células que não aderiram foram descartadas. Aproximadamente uma semana após este processamento, começaram a aparecer colônias fibroblastóides, características de células-tronco mesenquimais.

3.5 – OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA MEDULA ÓSSEA HUMANA

CTM de MOH foram cedidas pelos pesquisadores Dr. Mario Ferreti Filho e Dra. Eliane Antonioli do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE) do Hospital Israelita Albert Einstein.

As coletas de medula óssea da região proximal da tíbia e/ou distal do fêmur foram realizadas no Centro Cirúrgico do Hospital Israelita Albert Einstein e Hospital Municipal de Barueri, durante o procedimento cirúrgico do joelho (artroplastia e/ou prótese). A medula óssea foi coletada utilizando agulha específica: Agulha Biópsia Óssea 8 G x 10 cm (DJ 4008X LABO, Cardinal Health - Jamshidi). Dez a vinte mililitros do aspirado de medula óssea da diáfise do fêmur foram transferidos para tubo de 50 ml contendo o mesmo volume de PBS. A solução foi adicionada a uma camada de igual volume de solução de Ficoll (d=1,073g/mL) e centrifugada a 2200 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, proporção diluição (1:1:1). A fração correspondente às células mononucleares foi coletada, lavada com PBS por duas vezes e semeada em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio de cultura DMEM Low Glucose (Gibco) suplementado com 2mM de L-glutamina (Gibco), 10U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 15% de SFB (Gibco).

3.6 – CITOMETRIA DE FLUXO

As análises imunofenotípicas das CTM e expressão dos marcadores fenotípicos que definem as CTM durante o processo de diferenciação celular foram feitas através da citometria digital multiparâmetro (FACSARIA – Becton Dickinson) e os experimentos foram conduzidos com anticorpos monoclonais de superfície disponíveis comercialmente. As técnicas de coloração, aquisição e análise foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante. De maneira geral, uma amostra de 1000µl, contendo 10^6 células, foi distribuída entre os tubos, em seguida as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais de interesse (CD14 FITC (isotiocianato de fluoresceína), CD29 PE (ficoeritrina), CD44 PE, CD45 PE-Cy5, CD90 APC (alofocianina), CD117 APC, HLA-DR PE Cy5, CD133 APC, CD105 PE e anticorpo secundário de ovelha anti-camundongo PE). Depois as amostras foram incubadas a 4°C, protegidas da luz, por 30 minutos, lavadas com solução tampão e fixadas com paraformaldeído 1%. A análise dos dados foi realizada utilizando o aplicativo FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

3.7 – DIFERENCIAÇÃO MULTILINHAGEM DE CTM

Para os experimentos de diferenciação multilinhagem, células-tronco de quarto a quinto subcultivo foram recuperadas dos frascos de cultura com tripsina diluída na proporção de 1:10 com PBSA e acrescentada de 20 µL de (ácido etilenodiamino tetraacético) EDTA 0,5 M. Após recuperação, as células foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente, ressuspendidas em 1 mL de meio LG-DMEM (Meio essencial mínimo modificado por Dubelco com baixa glicose) e contadas em câmara de Neubauer.

Para as diferenciações osteogênica e adipogênica as células foram então semeadas em placas de cultura aderentes de seis poços na densidade de 10^4 células/poço e mantidas em estufa à 37°C com 5% CO₂. Quando as células atingiram 70% de confluência o grupo controle continuou a ser cultivado em meio LG-DMEM (controle osteogênico) ou em HG-DMEM (Meio essencial mínimo modificado por Dubelco com alta glicose) (controle adipogênico) e os grupos submetidos aos protocolos de diferenciação foram cultivados em meios específicos e suplementados como explicado a seguir:

Diferenciação osteogênica: células foram cultivadas por 24 dias em L-DMEM suplementado com SFB 10%, antibióticos, ácido ascórbico-2-fosfato 50 µg/mL, dexametasona 10^{-8} mol/L, e β-glicerolfosfato 10 mmol/L.

Diferenciação adipogênica: células foram cultivadas por 24 dias em H-DMEM suplementado com SFB 10%, L-glutamina 2 mM, Ciprofloxacina 10 µg/mL, insulina 5 µg/mL, indometacina 200 µM, 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) 100 µg/mL e dexametasona 100 nM.

Para a diferenciação condrogênica utilizamos o sistema de cultura em *pellet* (Johnstone *et al.*, 1998) mantido em estufa à 37°C com 5% CO₂. Após contagem em câmara de Neubauer, 2×10^5 células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Para o grupo controle, o sobrenadante foi removido e substituído por αMEM suplementado com SFB 10% e para o grupo submetido ao protocolo de diferenciação o meio sobrenadante foi removido e substituído como explicado a seguir:

Diferenciação condrogênica: células foram cultivadas por 21 dias em αMEM suplementado com SFB 10%, ácido ascórbico 50 µg/mL, TGF-β1 2ng/mL e insulina 6,25 µg/mL.

3.8 – COLORAÇÕES DE VERMELHO DE ALIZARINA, *OIL RED* E AZUL DE TOLUIDINA

Durante a diferenciação de CTM em osteoblastos, ocorre a deposição de matriz extracelular e expressão aumentada da fosfatase alcalina envolvida na mineralização dessa matriz, através da adição de grupos cálcio e fosfato (Birmingham *et al.*, 2012). Para avaliarmos a diferenciação osteogênica, CTM diferenciadas e não diferenciadas foram submetidas à coloração de vermelho de alizarina, cujo corante, após formar um complexo com grupos cálcio, exibe uma cor alaranjada mostrando a presença de matriz mineralizada. Para isso, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS. Células foram então incubadas com solução de vermelho de alizarina 1% (pH 4,1 – 4,3) em água por 1 hora e lavadas com PBS. Células foram analisadas e imagens capturadas em microscópio Nikon Eclipse TE 300.

Coloração de *oil red*, um corante hidrofóbico e lipossolúvel que cora ambientes lipídicos em vermelho, foi utilizada para avaliar a adipogênese. Para isso as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, em temperatura ambiente e lavadas com isopropanol 60%. Células foram incubadas com solução de *oil red* por 15 minutos e lavadas com PBS. Células foram analisadas e imagens capturadas em microscópio Nikon Eclipse TE 300.

Durante a diferenciação condrogênica, as CTM são rodeadas por matriz extracelular consistindo de colágenos e agregados de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que podem ser detectados por coloração de azul de toluidina, um corante básico com afinidade por grupos ácidos presentes na MEC. Para isso, os agregados celulares foram lavados com PBS e fixados com paraformaldeído 4% por 30 minutos em temperatura ambiente. Células foram desidratadas em diluições

seriadas de etanol (etanol 70%, etanol 90% e etanol absoluto) e embebidas em blocos de parafina. Os cortes foram corados com solução de azul de toluidina.

3.9 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM

Para os experimentos de diferenciação hepatogênica, CTM de quarto a sexto subcultivo foram recuperadas dos frascos de cultura com tripsina diluída na proporção de 1:10 com PBSA e acrescentada de 20 µL de EDTA 0,5 M. Após recuperação, as células foram centrifugadas à 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente, ressuspendidas em 1 mL de meio IMDM ou LG-DMEM e contadas em câmara de Neubauer. CTM foram então semeadas em placas de cultura aderentes de 6 Wells na densidade de 10^4 células/poço e mantidas em estufa à 37°C com 5% CO₂. Quando as células atingiram 70% de confluência o grupo controle continuou a ser cultivado em meio IMDM ou LG-DMEM e os grupos submetidos aos protocolos de diferenciação hepatogênica foram cultivados em meios suplementados como explicado a seguir e esquematizado na figura 5:

MÉTODO 1 – Células foram cultivadas por 4 semanas em IMDM suplementado com SFB 10%, penicilina/estreptomicina (100 U/mL), HGF 20 ng/mL e FGF4 10 ng/mL (Figura 5A).

MÉTODO 2 – Células foram cultivadas por 4 semanas em IMDM suplementado com SFB 10%, penicilina/estreptomicina (100 U/mL), HGF 40 ng/mL e FGF4 10 ng/mL (Figura 5B).

MÉTODO 3 – Células foram cultivadas por 4 semanas em meio HG-DMEM condicionado de HepG2 mais IMDM, suplementado com SFB 10% e penicilina/estreptomicina (100 U/mL), na proporção 1:1. Para a utilização do meio de HepG2, esse foi recolhido dos frascos de cultura contendo HepG2 e centrifugado à

200 g por 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentação de eventuais partículas sólidas ou células mortas. O sobrenadante, contendo metabólitos gerados pela HepG2, foi recolhido e denominado meio condicionado de HepG2. O meio condicionado de HepG2 foi juntado na proporção 1:1 com IMDM fresco para suprir as células dos nutrientes consumidos pela HepG2 no meio condicionado. Para esse protocolo foi feito um grupo controle onde as células-tronco eram cultivadas em meio HG-DMEM e IMDM misturados na proporção 1:1 (Figura 5C).

MÉTODO 4 – Para indução as células foram cultivadas por duas semanas em meio de diferenciação contendo IMDM suplementado com SFB 10%, penicilina/estreptomicina (100 U/mL), dexametasona 0.5 μ M, ITS⁺ Premix 50 mg/mL (insulina 25 mg/mL, transferrina 25 mg/mL, selenito de sódio 25 μ g/mL) e HGF 50 ng/mL. Para maturação as células foram tratadas por mais duas semanas com meio de maturação contendo IMDM suplementado com SFB 10%, antibióticos, dexametasona 0.5 μ M, ITS⁺ Premix 50 mg/mL e OSM 50 ng/mL (Figura 5D).

MÉTODO 5 – Para indução as células foram cultivadas por 2 semanas em IMDM suplementado com SFB 5%, Soro de Rato Hepatectomizado (SRH) 5% (modelo agudo do item 3.13 de Materiais e Métodos), penicilina/estreptomicina (100 U/mL), dexametasona 0.5 μ M e HGF 50 ng/mL. Para maturação as células foram tratadas por mais duas semanas com meio de maturação contendo IMDM suplementado com SFB 5%, SRH 5%, antibióticos, dexametasona 0.5 μ M e OSM 50 ng/mL. Para esse protocolo foi incluído um grupo controle onde as células-tronco foram cultivadas em IMDM suplementado com SFB 5%, Soro de Rato Controle (SRC) 5% e penicilina/estreptomicina (100 U/mL).

Para obtenção de soro de rato, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com peso aproximado de 200 g obtidos no Biotério do IQ-USP. Para obtenção

de SRH, os ratos foram submetidos a hepatectomia 70%, e eutanasiados 24 horas após hepatectomia e o sangue recolhido e processado para a separação do soro. Para obtenção de SRC o sangue foi recolhido a partir de ratos não submetidos à hepatectomia 70% (Figura 5E).

MÉTODO 6 – Células foram privadas de soro por 2 dias em IMDM suplementado com EGF 20ng/mL e FGF2 10ng/mL. A diferenciação foi induzida primeiramente pelo tratamento das células com IMDM suplementado com HGF 20 ng/mL, FGF2 10 ng/mL e nicotinamida (0,61 g/L) por 7 dias. Após este período as células foram tratadas com IMDM suplementado com OSM 20 ng/mL, dexametasona 1 mol/L e ITS 50 mg/mL por 14 dias (Figura 5F).

MÉTODO 7 – Células foram submetidas a uma semana de diferenciação endodérmica de quatro passos, iniciando com o cultivo das células por 24h em IMDM suplementado com activina A 100 ng/mL privadas de SFB, 2 dias em IMDM suplementado com SFB 0,5%, activina A 100 ng/mL e FGF4 10 ng/mL, 2 dias em IMDM suplementado com SFB 2%, activina A 100 ng/mL, FGF4 10 ng/mL e 2 dias em IMDM suplementado com SFB 2%, ITS 1x, HGF 10 ng/mL, FGF4 10 ng/mL e EGF 20 ng/mL. Após diferenciação endodérmica as células foram submetidas à diferenciação hepática como descrito acima no método 6, excluindo o passo da sincronização celular por 2 dias (Figura 5G).

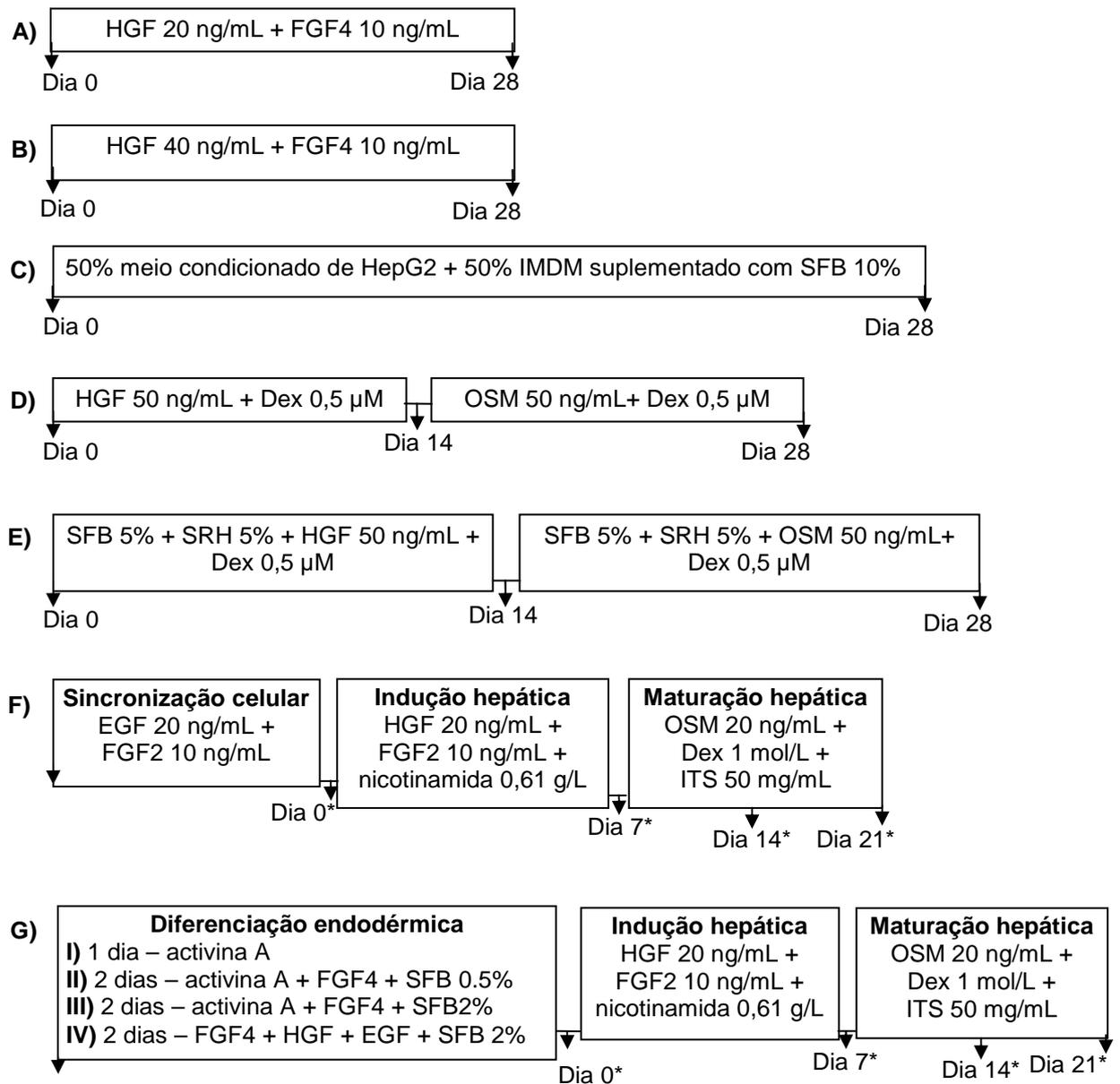


FIGURA 5: Representação esquemática dos diferentes protocolos utilizados para diferenciação hepatogênica. Após atingirem 70% de confluência (dia 0), CTM foram submetidas aos seguintes tratamentos. **A)** Método 1. **B)** Método 2. **C)** Método 3. **D)** Método 4. **E)** Método 5. **F)** Método 6. **G)** Método 7. O asterisco (*) é utilizado para indicar os dias da diferenciação hepática após o término das fases de sincronização celular e da diferenciação endodérmica dos métodos 6 e 7, respectivamente.

3.10 – DETECÇÃO DE GLICOGÊNIO

CTM foram acondicionadas sobre lamínulas estéreis em placas de 6 poços, em volume final de 2 mL de meio e recuperadas nos dias 0, 14 e 21 dias após a diferenciação hepática para análise da capacidade de sintetizar e estocar glicogênio (Kang *et al.*, 2006). Glicogênio hepático foi detectado utilizando-se células lavadas com tampão PBS, fixadas por 30 minutos em paraformaldeído a 10%. Decorrido esse tempo, as células foram novamente lavadas e foi realizado a permeabilização com Triton X 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a permeabilização e lavagem com água Milliq®, as células foram oxidadas com ácido periódico a 1% por 10 minutos e novamente lavadas com água Milliq®. Em seguida, as células foram tratadas com reagente de Schiff por 10 minutos, lavadas com água Milliq® por 10 minutos e os núcleos corados com hematoxilina por 2 minutos, seguido de lavagem com água Milliq®. Células foram analisadas e imagens capturadas em um microscópio óptico Nikon Eclipse TE 300.

3.11 – IMUNOFLUORESCÊNCIA

CTM foram acondicionadas sobre lamínulas estéreis em placas de 6 poços, em volume final de 2 mL de meio e recuperadas nos dias 0, 14 e 21 dias após a diferenciação hepática para análise da expressão de ALB por imunofluorescência. Para o início da imunofluorescência, essas células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos. Decorrido esse tempo, as células foram novamente lavadas e foi realizado a permeabilização com Triton X 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas e foi realizado o bloqueio com gelatina 2% em PBS por 30 minutos e então foram incubadas com o anticorpo primário policlonal anti-ALB, (DakoCytomation), na concentração 1:100 à temperatura

ambiente por 1h e 30min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz com anticorpo secundário anti-rabbit conjugado com o fluorocromo Texas Red®, (AbD Serotec). Decorrido o tempo as células foram novamente lavadas com PBS e as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas sobre lâminas cobertas com solução de montagem Vectashield®, conjugada com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) para visualização do núcleo e observadas no microscópio de fluorescência. Para o controle da reação, em uma das amostras não foi realizado a incubação com o anticorpo primário.

Para o controle positivo para o anticorpo anti-ALB, foi utilizada a linhagem HepG2 e para o controle negativo foram utilizadas CTM não diferenciadas.

3.12 – PCR EM TEMPO REAL

A extração de RNA das de CTM de MOH foi realizada segundo protocolo do “kit” “RNAspin Mini RNA Isolation Kit” (GE), utilizado para extração de RNA. O cDNA foi gerado à partir de amostras deste RNA, utilizando-se SuperScript (Invitrogen, Carlsbad, California). Os primers utilizados (Tabela 1) para amplificação por PCR em tempo real foram desenhados utilizando-se o Primer Express 2.0 Software (Applied Biosystems, FosterCity, California) ou o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Para a quantificação do produto formado durante a reação de PCR em tempo real foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (Applied Biosystems). O gerenciamento do termociclador GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems).

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. Como template foram utilizados 2 µL do cDNA sintetizado anteriormente, 3,04 µL de água, 0,96 µL do conjunto de primers na concentração final previamente determinada e 6 µL do reagente SYBER®Green Dye. As reações são realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C de 15 segundos e 60°C por 1 minutos. Para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventual contaminação, uma reação de dissociação do produto amplificado é realizada ao término de cada reação. É estabelecido um *threshold*, na fase exponencial de amplificação do gene, e a partir da intersecção deste com a curva de amplificação é obtido o Ct da amostra (do inglês *Cycle Threshold*, ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial). A normalização e a determinação da expressão dos genes-alvo (Tabela 1) são realizadas através da expressão do gene constitutivo *housekeeping gene*, GAPDH (Tabela 1).

Além disso, são realizados testes para determinação da concentração final e eficiência dos iniciadores. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornecerá o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$) que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

A análise dos resultados da PCR em tempo real foi semiquantitativa, segundo o modelo matemático do método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak e Schmittgen, 2001). O cálculo baseia-se na comparação dos valores de Ct expresso em unidades arbitrárias, entre dois grupos de amostras no momento em que a PCR atinge a fase exponencial de

amplificação. Reações utilizando oligonucleotídeos para o gene constitutivo GAPDH foram utilizadas para normalizar os resultados obtidos. De acordo com este modelo, utiliza-se a seguinte fórmula:

fold-change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que:

ΔCt = Ct do gene-alvo - Ct do gene referência

$\Delta\Delta Ct$ = $\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$

ΔCt_1 = amostra de interesse

ΔCt_2 = amostra do grupo controle

TABELA 1: Oligonucleotídeos usados para as análises de PCR em tempo real.

GENE	SEQUÊNCIA
AFP	FW 5'TCCAGGAGAGCCAAGCATTG3' RV 5'GTAAGCAACGAGAAACGCATTTT3'
c-Met	FW 5'ACTGCCCAGACCCCTTATATGA3' RV 5'TATCCGGGACACCAGTTCAGA3'
ALB	FW 5'CCTAGGAAAAGTGGGCAGCAA3' RV 5'TGGTTCAGGACCACGGATAGA3'
GAPDH	FW 5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC -3' RV 5'- TCCACCACCCTG TTGCTGTA -3'

As sequências cMet, ALB e AFP foram utilizadas como marcadores hepatocíticos e a sequência GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como controle endógeno.

3.13 – MODELO ANIMAL DE FIBROSE HEPÁTICA INDUZIDA POR DIMETILNITROSAMINA

O protocolo experimental, adotado neste projeto, foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 11/04/08 e do HIAE CAAE-0110.0.028.000-09.

Ratos da linhagem Wistar, do sexo masculino com peso aproximado de 150 – 200 g foram obtidos e mantidos no Biotério do Instituto de Química da USP ou no Centro de Experimentação e Treinamento em Cirúrgica (CETEC) do IIEP/HIAE. Os animais foram mantidos em gaiolas próprias para ratos em número de até cinco animais por gaiola, em ambiente com iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso irrestrito a água e ração e em condições de umidade e temperatura padrões de um biotério.

MODELO AGUDO: Hepatectomia de 70% do fígado para indução de insuficiência hepática aguda (Tannuri *et al.*, 2007).

Após anestesia com isofluorano o animal teve sua região abdominal raspada para retirada de pelo e foi feita uma pequena abertura (em torno de 2cm), com utilização de material cirúrgico. Pressionando com as mãos ao redor desta abertura, foram expostos 70% do fígado, o que corresponde aos lóbulos direito médio, esquerdo médio e esquerdo lateral, seguiu-se a ligadura com fio de algodão 3.0, para controlar o sangramento. Com auxílio de tesoura cirúrgica, 70% do fígado foi cortado logo acima da ligadura. O animal teve o peritônio suturado com fio absorvível CATGUT 3.0 e a pele com fio de náilon 3.0. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em uma cama térmica até o seu completo restabelecimento no escuro durante as primeiras 3 horas e com comida e água acessíveis. O animal recebeu analgesia com Movatec (Meloxicam) por via intramuscular, na dose de 1mg/kg após a cirurgia.

Em alguns casos, após 24 horas de cirurgia os ratos controle ou submetidos à hepatectomia 70% foram anestesiados com injeção intramuscular da mistura anestésica de quetamina e xilazina na dose 50mg/kg e 5 mg/kg respectivamente. A

cavidade abdominal foi aberta e o sangue coletado da veia cava abdominal com auxílio de seringa Hamilton de 3 mL e dispensado em tubo próprio para separação de soro da BD Vacutainer® de 3.5 mL. Após centrifugação a 1.811 g por 10 minutos a 25°C o soro foi recolhido e armazenado em freezer -20°C até a sua utilização.

MODELO CRÔNICO: Administração da droga DMN (Sigma) para indução de insuficiência hepática crônica, adaptado de (Ozawa *et al.*, 2006).

75 ratos foram divididos em 6 grupos (G1, G2, G3, G4, G5 e G6) para a realização de experimentos de dose-resposta para padronizar a melhor concentração de DMN a ser aplicada e avaliar o efeito da hepatectomia de 30% nos animais tratados com DMN (modelo misto). A solução de DMN diluída em PBSA, na concentração correspondente a cada grupo, foi administrada por via intraperitoneal (ip) 3 vezes por semana, durante 4 semanas, ou no caso do modelo misto (DMN/hepatectomia) 3 vezes por semana, durante 3 semanas, seguido da hepatectomia de 30% na quarta semana e seguido de mais uma semana de tratamento com DMN (Figura 6). Os animais foram eutanasiados ao término do tratamento para verificar a indução de fibrose hepática. Após eutanásia, com mistura anestésica quetamina/xilazina, o sangue foi recolhido e processado como descrito acima para o modelo agudo. A função hepática foi avaliada através dos níveis séricos de ALT, AST, FA e bilirrubina total (BT), que tiveram a concentração determinada através de ensaios cinéticos e colorimétricos da marca Labtest® em aparelho próprio para este tipo de análise. Biópsias de fígado foram recolhidas e fixadas em paraformaldeído 4% e armazenadas em geladeira até o processamento para as análises histológicas por colorações de HE e tricromo de Masson.

Os ratos que receberam doses de DMN de 2, 5 e 7 $\mu\text{g/g}$ responderam à DMN de forma semelhante e, portanto, foram agrupados em um único grupo denominado G3, DMN dose intermediária, para simplificar a descrição dos resultados.

Descrição dos grupos:

G1: grupo PBSA, animais tratados com PBSA e não submetidos à hepatectomia (n = 25).

G2: animais tratados com PBSA e submetidos à hepatectomia 30% (n=3).

G3: animais tratados com DMN nas concentrações que variaram entre 2, 5 e 7 $\mu\text{g/g}$ de peso animal (n = 9).

G4: animais tratados com DMN na concentração de 10 $\mu\text{g/g}$ de peso do animal (n = 28).

G5: animais tratados com DMN na concentração de 2 $\mu\text{g/g}$ de peso do animal e submetidos à hepatectomia a 30% (n = 7).

G6: animais tratados com DMN na concentração de 10 $\mu\text{g/g}$ de peso do animal e submetidos à hepatectomia a 30% (n = 7).

MODELO DE TERAPIA CELULAR:

Para o experimento de terapia celular, CTM de VCUH de quarto subcultivo foram recuperadas dos frascos de cultura com tripsina diluída na proporção de 1:10 com PBSA e acrescentada de 20 μL de EDTA 0,5 M. Após recuperação, as células foram centrifugadas a 200 g por 5 minutos à temperatura ambiente, ressuspendidas em 1 mL de meio IMDM ou LG-DMEM e contadas em câmara de Neubauer. Após contagem, 1×10^7 CTM de VCUH foram diluídas em 300 μL de PBSA e injetadas por via da veia caudal uma semana após o término do tratamento com DMN. Os animais

foram eutanasiados uma semana após o transplante de células para o recolhimento de amostras.

38 ratos Wistar foram divididos em 3 grupos:

G7: grupo controle, animais tratados com PBSA (n=10).

G8: animais tratados com DMN 10 µg/g e PBSA (n=18)

G9: animais tratados com DMN e CTM de VCUH (n=10)

3.14 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos dados coletados a partir dos parâmetros bioquímicos nos experimentos de indução de fibrose hepática foram feitas pelo pacote estatístico SAS, utilizando-se teste t não pareado (experimento dose-resposta) e procedimento GLM para dados pareados (experimento do modelo misto), onde o efeito do tratamento, hepatectomia e sua interação foi testado. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. $P < 0,05$ foi considerado significativo em todos os testes.

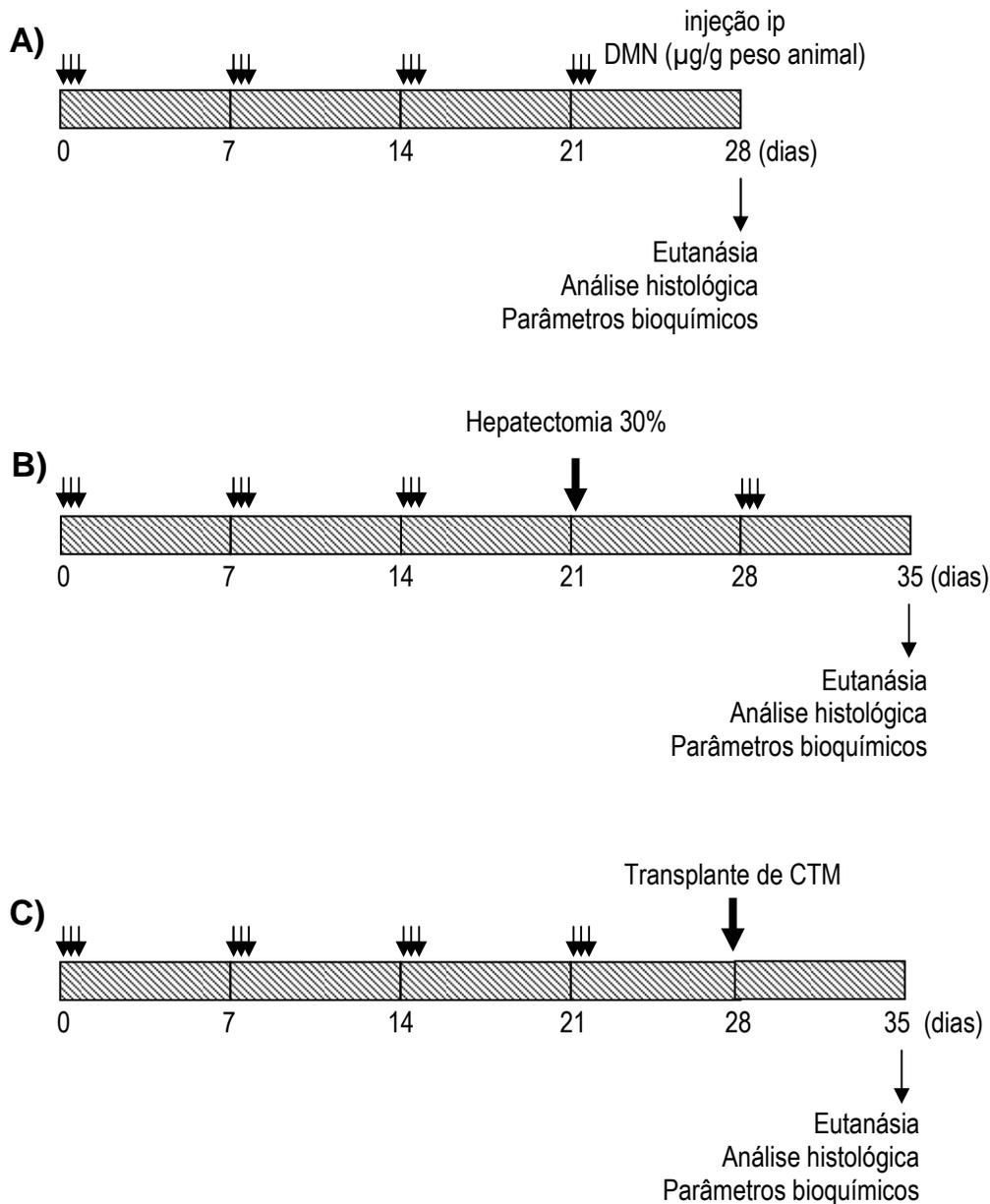


FIGURA 6: Representação esquemática do delineamento experimental de indução de fibrose hepática e transplante de CTM. Ratos foram injetados ip (intraperitonealmente) com DMN por **(A)** 3 vezes por semana durante 4 semanas ou por **(B)** 3 vezes por semana durante 3 semanas, seguido de hepatectomia a 30%, seguido de mais uma semana de tratamento com DMN. Uma semana após o término da indução de fibrose hepática os animais foram eutanasiados para coleta das amostras para análises histológicas e bioquímicas. **C)** Uma semana após o término do tratamento de ratos Wistar com DMN $10\mu\text{g/g}$, 10^7 CTM foram injetadas, por via da veia caudal e os ratos foram eutanasiados uma semana após o transplante de células.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados gerados neste trabalho serão apresentados divididos de acordo com os objetivos propostos. Na primeira parte, descreveremos os resultados obtidos para a validação das CTM, detalhando as características morfológicas e imunofenotípicas e a capacidade de diferenciação multilinhagem das células isoladas por nós, para confirmar que se trata de CTM *bona fide* como descrito na literatura. Na segunda parte, discutiremos os vários protocolos adaptados a partir da literatura e testados para a obtenção de células similares a hepatócitos a partir de CTM. E por fim, na terceira parte discutiremos os resultados obtidos a partir da padronização do modelo experimental de DMN e do transplante de CTM neste modelo.

4.1 – VALIDAÇÃO DAS CTM UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Há na literatura diversos métodos para isolar células-tronco de fontes variadas, incluindo, isolamento de subpopulações por citometria de fluxo (*cell sorting*), centrifugação por gradiente de densidade, aderência ao plástico, digestão enzimática e seleção imunomagnética (Christodoulou *et al.*, 2013; Fiegel *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2002). No presente trabalho, CTM de MOH, de rato (MOR) e do SCUH foram isoladas pelo uso combinado da centrifugação por gradiente de densidade e a aderência ao plástico. Para a obtenção de CTM de VCUH foi utilizado o método da digestão por collagenase associado à aderência ao plástico. Independentemente do método empregado e da fonte de CTM usada, a cultura primária dessas células caracterizou-se pela heterogeneidade até o segundo subcultivo, quando observadas por microscopia, pois nenhum dos métodos descritos na literatura é específico para CTM.

A presença de outros tipos de células mononucleares, como os monócitos, é uma característica da separação por centrifugação de gradiente de densidade, pois, essa técnica depende da densidade das células mononucleares para o isolamento, por exemplo, das CTM de MOH, de MOR e de SCUH. No caso das CTM de VCUH, após 24 horas dois tipos principais de células aderentes foram observados, uma população mais numerosa, de células menores e mais achatadas, similares às células endoteliais e uma população identificada como CTM com aparência fibroblastóide. Muitas células arredondadas, identificadas como células endoteliais, estavam suspensas no meio, mas pela contínua troca de meio essas células tornaram-se cada vez menos numerosas. De modo geral e independente da fonte de CTM, após duas semanas em cultura a maior parte das células contaminantes havia se descolado dos frascos de cultura, tornando predominantes as CTM pontiagudas e fusiformes (Figura 7A), que começaram a formar colônias de células morfologicamente similares a fibroblastos (Figura 7B). Após o segundo subcultivo as culturas de CTM tornaram-se mais homogêneas com a maioria das células mostrando morfologia fibroblastóide como observado nas figuras 7C e D. O primeiro subcultivo das CTM, independente da fonte isolada, ocorreu por volta de 15 a 20 dias após o isolamento. Não encontramos na literatura nenhum relato diferente do que descrito acima para cultura de CTM, independentemente da fonte utilizada para o isolamento dessas células (para outras revisões consultar (Covas *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004c; Schwartz *et al.*, 2002).

Pelo fato de não haver um marcador que seja específico para CTM, Dominici e colaboradores (Dominici *et al.*, 2006) sugeriram o uso de um repertório de anticorpos para caracterização imunofenotípica dessas células. Porém, diferentes laboratórios possuem repertórios próprios de anticorpos para tal caracterização

(Bieback *et al.*, 2004; Rossignoli *et al.*, 2013; Sarugaser *et al.*, 2005; Vellasamy *et al.*, 2012) e neste conjunto de anticorpos é comum faltar algum anticorpo sugerido por Dominici e colaboradores, bem como serem empregados anticorpos não sugeridos, o que beneficia um conhecimento maior dos diferentes marcadores de superfície expressos por CTM.

CTM são células aderentes que se ligam a MEC através de moléculas expressas em sua membrana envolvidas na interação célula-célula e célula-matriz (Yang *et al.*, 2011) e os múltiplos anticorpos utilizados na caracterização imunofenotípica reconhecem essas moléculas de adesão. Para avaliação do perfil imunofenotípico, CTM de quarto a quinto subcultivo foram analisadas por citometria de fluxo. CTM de SCUH, VCUH e de MOH apresentaram características similares sendo positivas para os marcadores CD29 (β_1 -integrina), CD44 (receptor de ácido hialurônico), CD90, CD73 e CD166 e negativas para os marcadores CD14, CD34, CD45, CD31, CD106, CD117, CD133 e HLA-DR, indicando que essas células não são de origem hematopoiética ou endotelial (Figura 8). Esses resultados sugerem que as células isoladas, por nós, possuem características básicas de CTM e estão de acordo com as características imunofenotípicas das CTM descritas na literatura (Chivu *et al.*, 2009; Rossignoli *et al.*, 2013). Embora CD90 seja um marcador positivo para CTM, é comum relatos descreverem essas células como sendo negativas para tal marcador (Covas *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004c). Isso ressalta a importância do uso de múltiplos marcadores de superfície celular para a caracterização imunofenotípica de CTM.

CTM isoladas de MOR não foram submetidas a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo, assim como Kang e colaboradores (Kang *et al.*, 2006) também não fizeram tal caracterização de CTM de MOR. Porém, quando

isoladas com método semelhante ao utilizado por nós, essas células mostraram-se negativas para CD11b, CD45 e CD90 e positivas para os marcadores de células mesenquimais CD44 e CD105 (Chen *et al.*, 2007). Em outro trabalho, CTM de MOR foram positivas para CD90 (Wang *et al.*, 2004).

Uma das principais características de CTM é a sua capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares. Para mostrar que as células isoladas por nós a partir de SCUH, VCUH e MOR eram células similares a CTM, nós as submetemos aos protocolos de diferenciação osteogênica e adipogênica. Para esses testes foram utilizadas células de terceiro a quinto subcultivo e as figuras escolhidas para mostrar as mudanças morfológicas durante a osteogênese e a adipogênese, e as respectivas colorações, são de CTM de MOR. As CTM de MOH devidamente caracterizadas e mostraram se tratar de células similares as CTM.

As mudanças morfológicas, durante a diferenciação osteogênica, foram visíveis após 10 dias de indução (Figura 9E) e ficaram mais evidentes após os 24 dias de indução osteogênica (Figura 9F). CTM diferenciadas tornaram-se retraídas quando comparadas as CTM não submetidas à diferenciação (Figuras 9A, B, C, D, E e F). Essas mudanças são resultado da perda de volume celular, redução do conteúdo das organelas e formação e alongamento de projeções citoplasmáticas finas que servem de conexão entre osteoblastos e entre osteoblastos e MEC (Prideaux *et al.*, 2012). CTM de SCUH, VCUH, MOH (dados não mostrados) e de MOR (Figuras 10A e B) mostraram coloração positiva para vermelho de alizarina após indução osteogênica (Figura 10B) quando comparadas ao grupo controle não diferenciado (Figura 10A). Esses resultados são similares aos obtidos por outros autores (Ayatollahi *et al.*, 2011).

Na diferenciação adipogênica, após 10 dias de indução, as mudanças morfológicas começaram a ficar notáveis entre CTM diferenciadas (Figura 9L) e não

diferenciadas (Figura 9H). Ao final dos 24 dias de diferenciação adipogênica, as CTM tornaram-se arredondadas e verificamos a presença de vacúolos intracelulares (Figura 9M) quando comparadas às CTM não diferenciadas (Figuras 9G, H e I). Vacúolos intracelulares também foram observados após indução adipogênica de CTM de VCUH (Wang *et al.*, 2004). Quando diferenciadas em adipócitos, as CTM mudam drasticamente sua morfologia fibroblastoide para uma forma esférica e acumulam gotículas de gordura (Gregoire *et al.*, 1998) que podem ser visualizadas após coloração de *oil red* (Lee *et al.*, 2004c). CTM de SCUH, VCUH, MOH (dados não mostrados) e de MOR (Figuras 10C, D e E) diferenciadas apresentaram numerosos vacúolos citoplasmáticos de gordura, corados por *oil red* (Figura 10D e E) em contraste ao grupo controle (Figura 10C), o que mostra a sua capacidade de internalizar e armazenar lipídeos.

Somente as CTM de VCUH e MOH foram diferenciadas em condrócitos. O sistema de cultura em micromassa permite interações célula-célula, semelhantes às que ocorrem na condensação das células mesenquimais para formar a pré-cartilagem durante o desenvolvimento embrionário (Lee *et al.*, 2004a). Após 21 dias de diferenciação, os *pellets* de CTM formaram uma estrutura tecidual tridimensional, sólida, como observado anteriormente (Muraglia *et al.*, 2003). Durante a diferenciação condrogênica de CTM, as células são rodeadas por MEC consistindo de colágenos e agregados de proteoglicanos e glicosaminoglicanos que podem ser detectados por coloração de azul de toluidina (Vater *et al.*, 2011). Na figura 11 podemos observar que CTM de MOH diferenciadas (Figura 11B) coraram mais intensamente quando comparadas as CTM não diferenciadas (Figura 11A).

As análises imunofenotípicas e a capacidade de diferenciação multilinhagem mostram que as células isoladas a partir de SCUH, VCUH, MOR e MOH possuem

características de CTM. Isso sugere que os métodos de isolamento combinando aderência ao plástico com centrifugação por gradiente de densidade (SCUH, MOH e MOR) ou digestão por collagenase (VCUH) são ideais para a obtenção de CTM a partir de fontes variadas, bem como descrito em outros trabalhos (Aurich *et al.*, 2007; Covas *et al.*, 2003; Lysy *et al.*, 2007).

Nosso próximo passo foi verificar o potencial dessas células na diferenciação em células similares a hepatócitos.

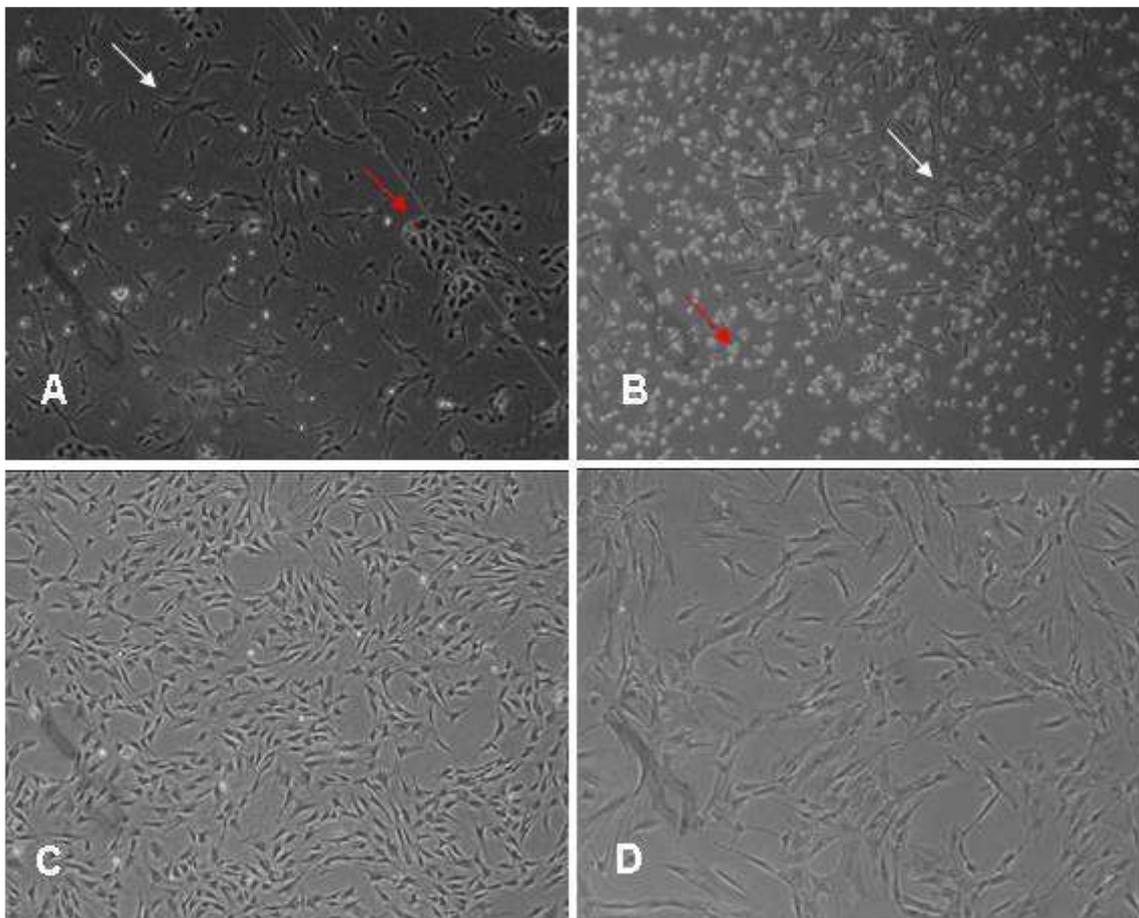


FIGURA 7: Características morfológicas de CTM provenientes de fontes variadas. **A)** Cultura primária de CTM de VCUH 15 dias após isolamento. As setas brancas indicam as CTM e as setas vermelhas indicam as células endoteliais. **B)** Cultura primária de CTM de SCUH 15 dias após isolamento. As setas brancas indicam uma colônia de CTM e as setas vermelhas indicam as células arredondas e suspensas compostas por outros tipos de células mononucleares. **C)** CTM de MOR no 4° subcultivo. **D)** CTM de MOH no nono subcultivo.

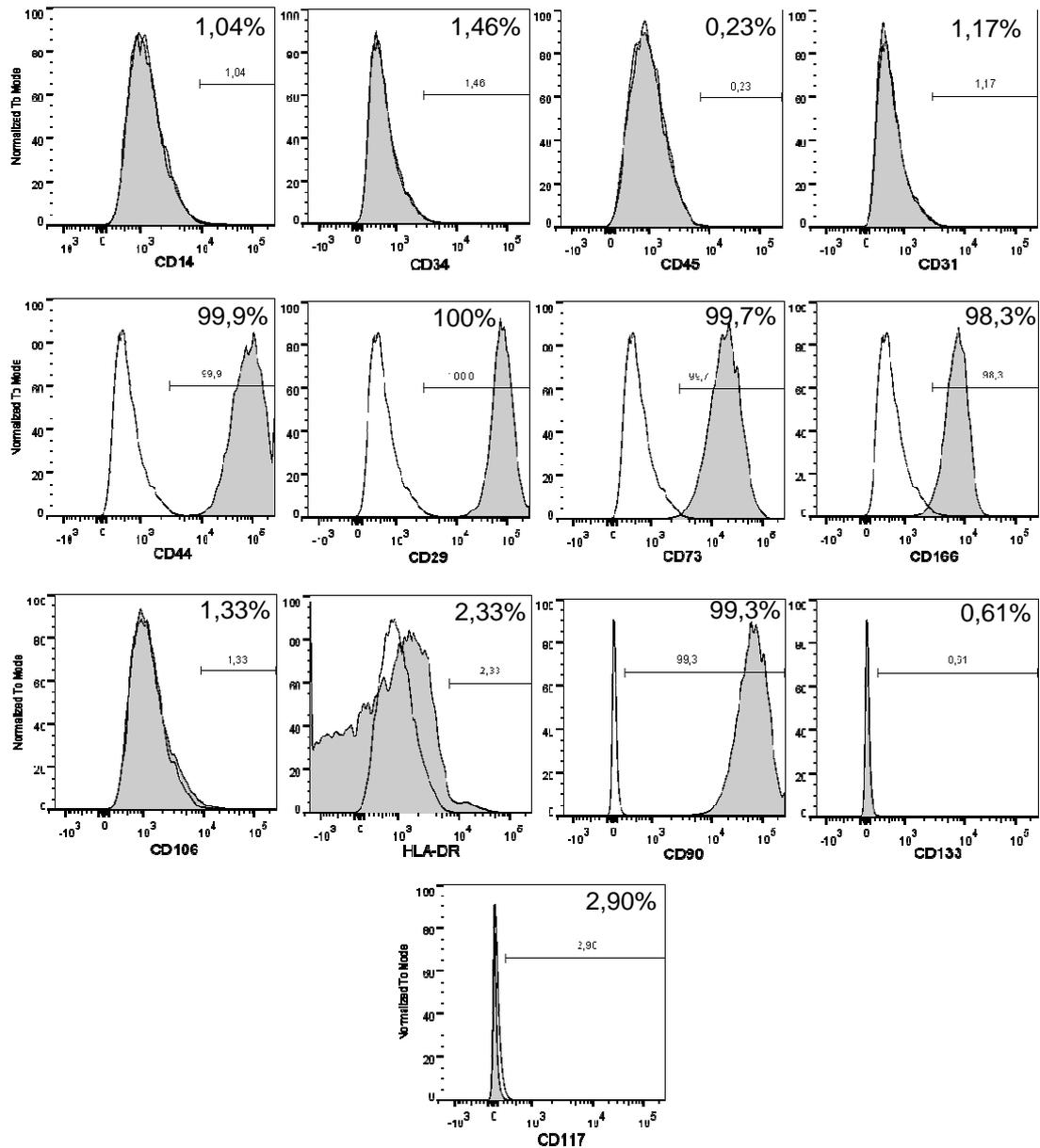


FIGURA 8: Gráficos das análises por citometria de fluxo de CTM de VCUH. Mostrando que essas são positivas para CD90, CD73, C29, CD44 e CD166 e negativas para CD14, CD34, CD45, CD106, CD31, CD117, CD133 e HLA-DR. A porcentagem de positividade de cada marcador está indicada.

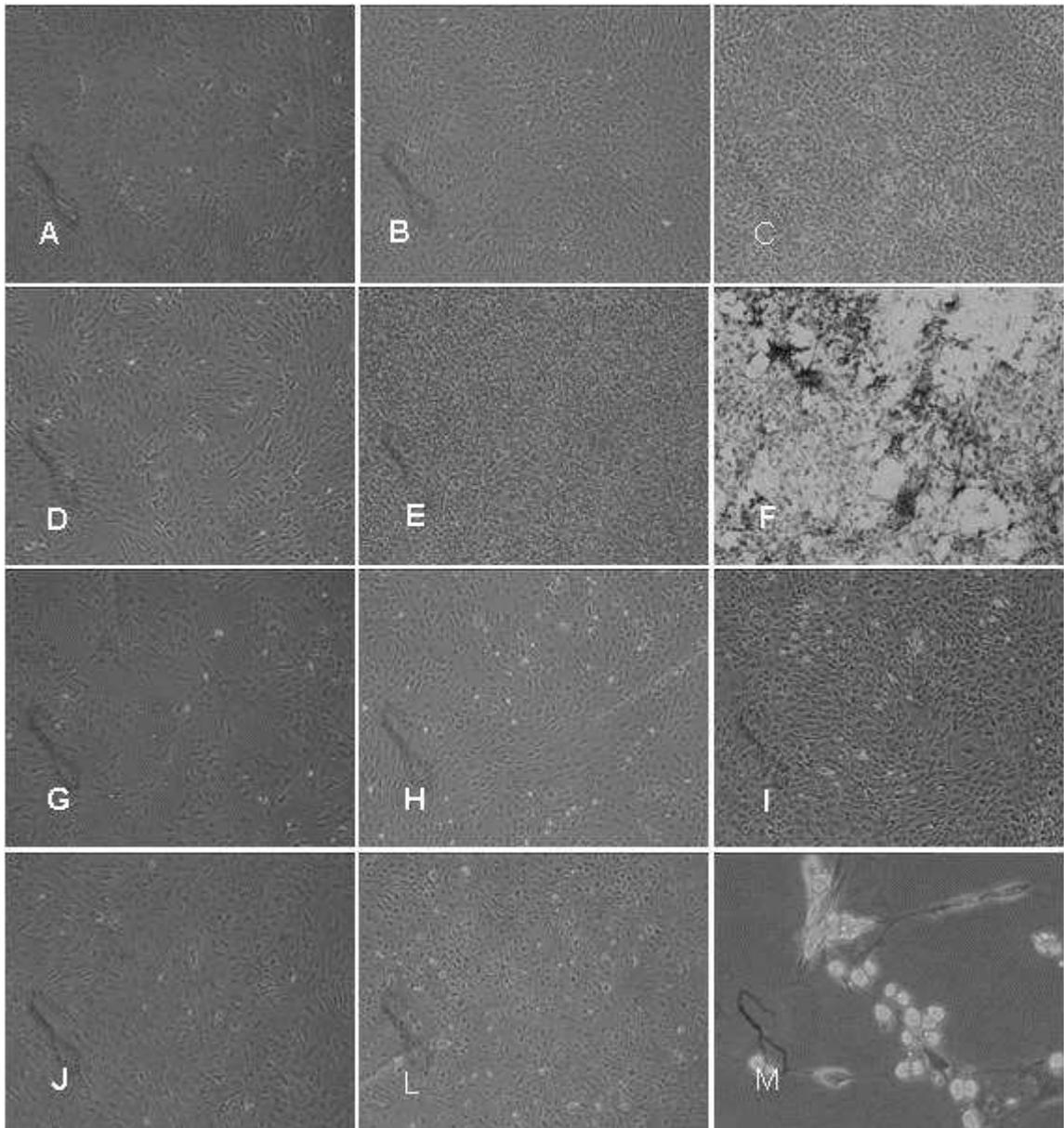


FIGURA 9: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação osteogênica e adipogênica. **A, B e C)** CTM de MOR cultivadas em LG-DMEM (controle osteogênico). **D, E e F)** CTM de MOR cultivadas em LG-DMEM suplementado com os reagentes para indução osteogênica. **G, H e I)** CTM de MOR cultivadas em HG-DMEM (controle adipogênico). **J, L e M)** CTM de MOR cultivadas em HG-DMEM suplementado com reagentes para indução adipogênica. As colunas I, II e III correspondem, respectivamente, aos dias 0, 10 e 24 após início de ambos os protocolos.

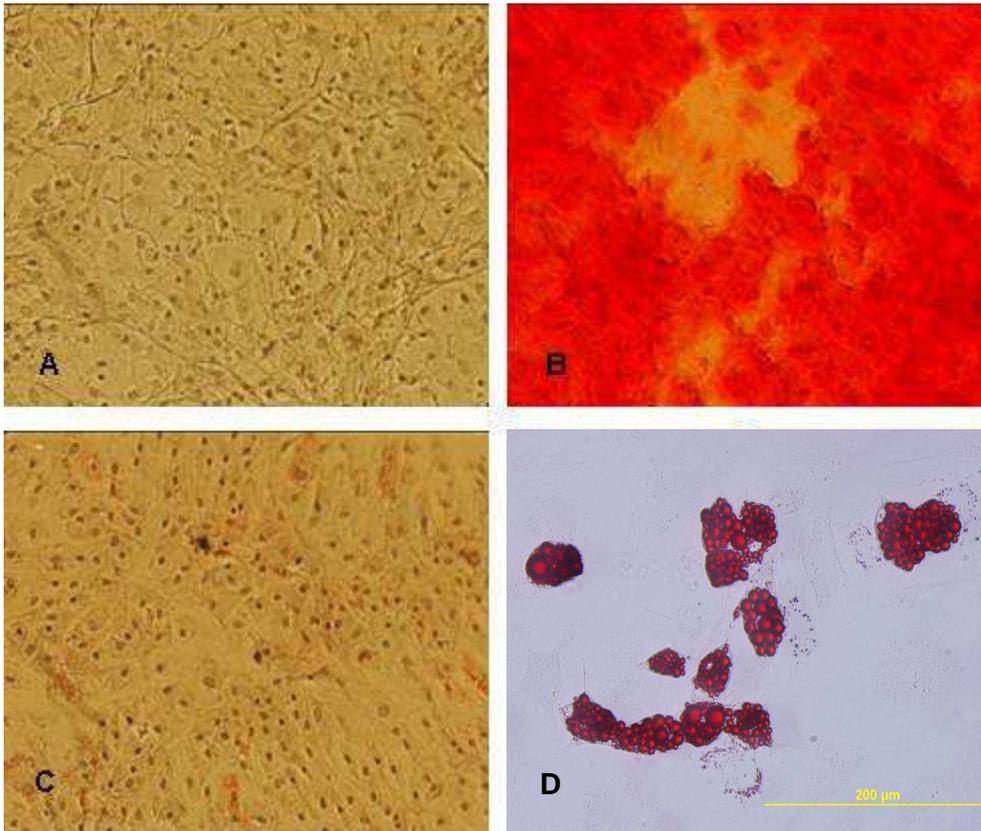


FIGURA 10: Colorações com vermelho de alizarina e *oil red* de CTM de MOR. **A e B)** CTM de MOR (grupos controle e experimental, respectivamente) submetidas a coloração por vermelho de alizarina após 24 dias de diferenciação osteogênica. **C e D)** CTM de MOR (grupos controle e experimental) submetidas a coloração por *oil red* após 24 dias de diferenciação adipogênica. **E)** Aumento de área específica da figura D.

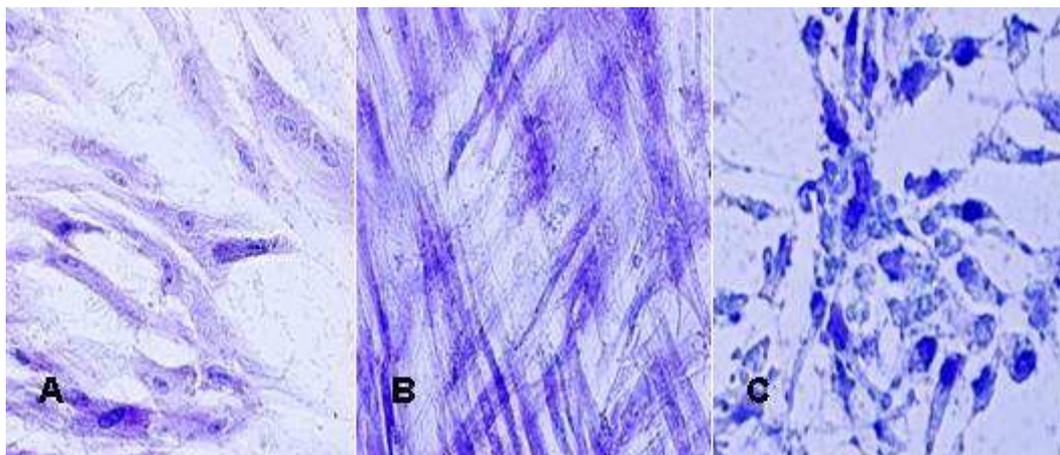


FIGURA 11: Coloração com azul de toluidina de CTM humanas. **A)** CTM de VCUH não diferenciadas. **B)** CTM submetidas a diferenciação condrogênica por 21 dias. **C)** Condrócitos maduros (controle positivo).

4.2 - INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM

Estão disponíveis na literatura diversas opções de protocolos para diferenciação hepática *in vitro* a partir de CTM (revisado por (Zhang *et al.*, 2013). Apesar da diversidade, esses protocolos apresentam poucas diferenças quanto ao tipo e concentração dos indutores hepatogênicos utilizados. Há no entanto, um grande repertório de citocinas e fatores de crescimento que incluem HGF, OSM, EGF, TGF- β 1, FGF2 e 4 e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), muitas vezes acrescidos de compostos químicos tais como, dexametasona, ácido retinóico, butirato de sódio, nicotinamida, norepinefrina e DMSO, que parecem ter importante papel na promoção da diferenciação hepática (Wu e Tao, 2012).

Na tentativa de obtenção de células similares a hepatócitos, CTM de SCUH, VCUH, MOR e de MOH foram submetidas à diferenciação hepática por diferentes protocolos baseados e adaptados da literatura recente. Nosso objetivo foi determinar, dentre as opções disponíveis na literatura, um protocolo eficiente e que pudesse ser utilizado rotineiramente para diferenciação hepática no Brasil. Começamos nossos testes de diferenciação hepática com os protocolos disponíveis, de um e dois passos, e em um primeiro momento avaliamos a diferenciação hepática quanto à capacidade das células obtidas de produzir e estocar glicogênio, confirmada por PAS. Os protocolos de um e dois passos foram testados em CTM de SCUH, VCUH e MOR, obtidas de dois ou três isolamentos diferentes. Os resultados relativos a essas tentativas de indução hepatogênica estão descritos para CTM de SCHU, VCUH e MOR, porém as fotos para a visualização dos resultados estão representadas por CTM de MOR. Para os testes com os protocolos de um e dois passos, as trocas de meio ocorreram duas vezes por semana e os meios de diferenciação foram suplementados com os antibióticos penicilina e estreptomicina.

4.2.1 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM UTILIZANDO PROTOCOLOS DE UM E DOIS PASSOS

O cultivo de CTM por 28 dias na presença de HGF 20 ng/mL e FGF4 10 ng/mL parece ser suficiente para obtenção de hepatócitos diferenciados a partir de CTM de MO humana, de rato e de camundongo quando cultivadas em frascos de cultura contendo matrigel, fibronectina ou matriz de colágeno (Schwartz *et al.*, 2002). Com este mesmo tratamento, células similares a hepatócitos também foram obtidas a partir de CTM de MOR e de SCUH, porém sem o uso de MEC, mostrando que os fatores de crescimento são suficientes para a diferenciação de CTM em hepatócitos (Kang *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2005). Em um dos primeiros protocolos testados, CTM foram cultivadas por 28 dias na presença de HGF 20 ng/mL e FGF4 10 ng/mL (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 1). No entanto, após o período de diferenciação, CTM não apresentaram mudanças morfológicas (Figura 12C e D) quando comparadas ao controle não diferenciado (Figura 12A e B) e foram incapazes de produzir e estocar glicogênio (Figura 14E), assim como o controle não diferenciado (Figura 14A), quando comparadas às células HepG2 (Figura 14C e D), nosso controle positivo. Devido à ineficiência de se obter células produtoras de glicogênio a partir do tratamento com HGF 20 ng/mL e FGF4 10 ng/mL, resolvemos realizar novos testes com esse protocolo, porém, alterando a concentração do HGF de 20 ng/mL para 40 ng/mL (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 2), numa concentração mais próxima da concentração de 50 ng/mL utilizada em outros trabalhos (Hong *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004). Mesmo com o aumento na concentração de HGF, CTM de SCUH, VCUH e MOR continuaram sem apresentar mudanças morfológicas em relação às células controle e também não produziram e estocaram glicogênio (dados não mostrados). Esse aumento de 2,5 vezes na concentração de HGF foi justificado

por Hong e colaboradores (Hong *et al.*, 2005) considerando que CTM de SCUH são células menos maduras que células-tronco adultas e que, portanto, uma maior quantidade de sinais exógenos seria necessária para ativar os sistemas de transdução de sinal hepatogênico.

O cultivo de CTM de MOR por 20 dias com meio condicionado de hepatócitos isolados de ratos saudáveis, sem acréscimo de qualquer fator de crescimento ou citocina envolvidos na diferenciação hepática, parece ser suficiente para a diferenciação hepatogênica (Chen *et al.*, 2007). As proporções de meio utilizada neste trabalho foram de 1:1 de meios fresco e condicionado, o que foi suficiente para que CTM de MOR expressassem AFP, CK18, CK19 e ALB demonstrado por RT-PCR e imunohistoquímica e produzissem glicogênio (Chen *et al.*, 2007). HepG2 é cultura comercial de hepatócitos isolados de hepatocarcinoma humano. Meio condicionado dessas células tem sido utilizado em protocolos para diferenciação de células-tronco embrionárias em osteócitos e condrócitos (Kang *et al.*, 2009) e eritrócitos (Fauzi *et al.*, 2012).

Numa próxima etapa experimental, para verificar a influência dos metabólitos gerados pelas células HepG2 sobre as CTM de SCHU, VCUH e MOR, testamos um protocolo onde essas células foram cultivadas por 28 dias, em meio condicionado de HepG2 (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 3). Para isso o meio foi trocado 2 vezes por semana e a cada troca de meio foi colocado 1 mL de meio IMDM fresco e 1 mL de meio condicionado por 48 horas de HepG2. Observamos mudança morfológica de CTM de MOR tratadas com esse protocolo (Figura 13F), quando comparadas ao controle de células não diferenciadas, porém, após coloração com PAS também não observamos a presença de grânulos de glicogênio (Figura 14B). Por esse tratamento, CTM de SCUH e VCUH não apresentaram mudanças morfológicas quando

comparadas ao controle e também não produziram glicogênio (dados não mostrados), indicando haver um início, mas não a continuidade do processo de diferenciação. Devido a incapacidade dos protocolos de um passo em promover a produção e estoque de glicogênio pelas CTM, buscamos testar novos protocolos de dois passos. No primeiro protocolo de dois passos testado (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 4), CTM de SCUH, VCUH e MOR foram cultivadas por duas semanas em meio contendo dexametasona 0.5 μ M e HGF 50ng/mL para a diferenciação hepática e da terceira a quarta semana foram cultivadas em meio contendo dexametasona 0.5 μ M e OSM 50 ng/mL para a maturação hepática. Ao fim do tratamento de indução hepatogênica, CTM de MOR perderam a morfologia fibroblastoide e se tornaram arredondadas (Figura 12F) quando comparadas ao controle de células não diferenciadas (Figura 12A e B). Porém, apesar da mudança morfológica, novamente essas células foram incapazes de produzir e estocar glicogênio (Figura 14F). Já as CTM de SCUH e VCUH não apresentaram mudanças morfológicas quando comparadas ao controle e também não foram capazes de produzir e estocar glicogênio (dados não mostrados). Utilizando esse mesmo tratamento Hong e colaboradores (Hong *et al.*, 2005) obtiveram células produtoras de ALB, CK18 e CK19 e AFP a partir de CTM de SCUH. Como CTM de MOR apresentaram mudanças morfológicas com esse tratamento, resolvemos testá-lo novamente, porém, acrescido de soro de rato recolhido 24 horas após hepatectomia, durante os 28 dias de indução hepatogênica (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 5).

Durante a regeneração hepática, após hepatectomia parcial, os hepatócitos, normalmente quiescentes, sofrem um ou dois ciclos de replicação para restaurar a massa hepática (Fausto *et al.*, 2006). Em ratos, a taxa de síntese de DNA em hepatócitos começa a aumentar após 12 horas da hepatectomia, quando entram na

fase S do ciclo celular, com pico máximo em torno de 24 horas e em células não parenquimais, essa indução ocorre em torno de 48 horas depois (Taub, 2004). Essa resposta, gerada após dano hepático é regulada por fatores de crescimento e citocinas incluindo HGF, EGF, TGFs, insulina, glucagon, TNF α (fator de necrose tumoral- α) e IL-6. Acredita-se que esses mesmos estímulos também sejam responsáveis pela proliferação e diferenciação de células progenitoras hepáticas que podem ser derivadas da medula óssea (Alison, 2002). Ong e colaboradores (Ong *et al.*, 2006) testaram a influência dos fatores solúveis, liberados durante a regeneração hepática, sobre CTM humanas. Neste trabalho, CTM foram submetidas, por 24 horas e com auxílio de *transwell*, ao cocultivo com biópsias de fígado de ratos induzidos ao dano hepático com injeção de cloreto de gadolínio. Seguido ao cocultivo, CTM foram submetidas a diferenciação hepatogênica por vinte dias com HGF, dexametasona e OSM. Ao final do protocolo, os autores observaram uma maior porcentagem de células produtoras de ALB no grupo das CTM submetidas ao cocultivo com biópsias de fígado injuriado em relação ao grupo submetido ao cocultivo com biópsias de fígado saudável. Sun e colaboradores (Sun *et al.*, 2013), trataram CTM isoladas de tecido adiposo de ratos com soro de ratos hepatectomizados, recolhido 24 horas após hepatectomia de 70%. Após tratamento, CTM adquiriram morfologia de hepatócito, expressaram AFP e passaram a secretar ALB e uréia. Em nosso trabalho, CTM de MOR tratadas com meio suplementado com soro de rato hepatectomizado (SRH) 5% (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 5) apresentaram mudanças morfológicas após 15 dias de tratamento (dados não mostrados). No 28° dia de tratamento, as CTM de MOR tornaram-se arredondadas (Figura 13D) quando comparadas ao grupo controle, tratado com soro de rato saudável (Figuras 13A e B). Quando essas células foram coradas com PAS mostraram ser capazes de produzir e estocar glicogênio

(Figuras 15B, C e D), uma característica de células hepáticas. Esses resultados sugerem que CTM de MOR podem se diferenciar em células semelhantes a hepatócitos quando induzidas com SRH

Na tentativa de alcançar o nosso objetivo em obter CTM diferenciadas capazes de estocar e produzir glicogênio, outros protocolos de dois passos foram testados e CTM isoladas de pele de camundongo e de polpa dentária também foram utilizadas. Porém, nenhum protocolo de um e dois passos foi eficaz em promover a produção e estoque de glicogênio por CTM humanas após o período de indução hepática. CTM de MOR mostram-se mais responsivas aos protocolos de indução hepática, apresentando mudanças morfológicas com o método similar ao utilizado por Hong e colaboradores (Hong *et al.*, 2005) e com meio condicionado de HepG2, e produziram e estocaram glicogênio quando tratadas com SRH. Esta diferença no potencial de diferenciação hepática entre células murinas e humanas também foi descrita por Schwartz e colaboradores (Schwartz *et al.*, 2002) ao observar que CTM de rato e camundongo mostraram maior porcentagem de células diferenciadas comparadas as CTM humanas submetidas a condições de cultura similares. Apesar do aparente potencial de diferenciação hepática das CTM de MOR em relação às CTM humanas, para os testes dos protocolos de três passos, resolvemos trabalhar somente com as CTM humanas, já que este projeto visa a obtenção de células similares a hepatócitos, que possam futuramente ser usadas em terapias celulares aplicadas a doenças do fígado.

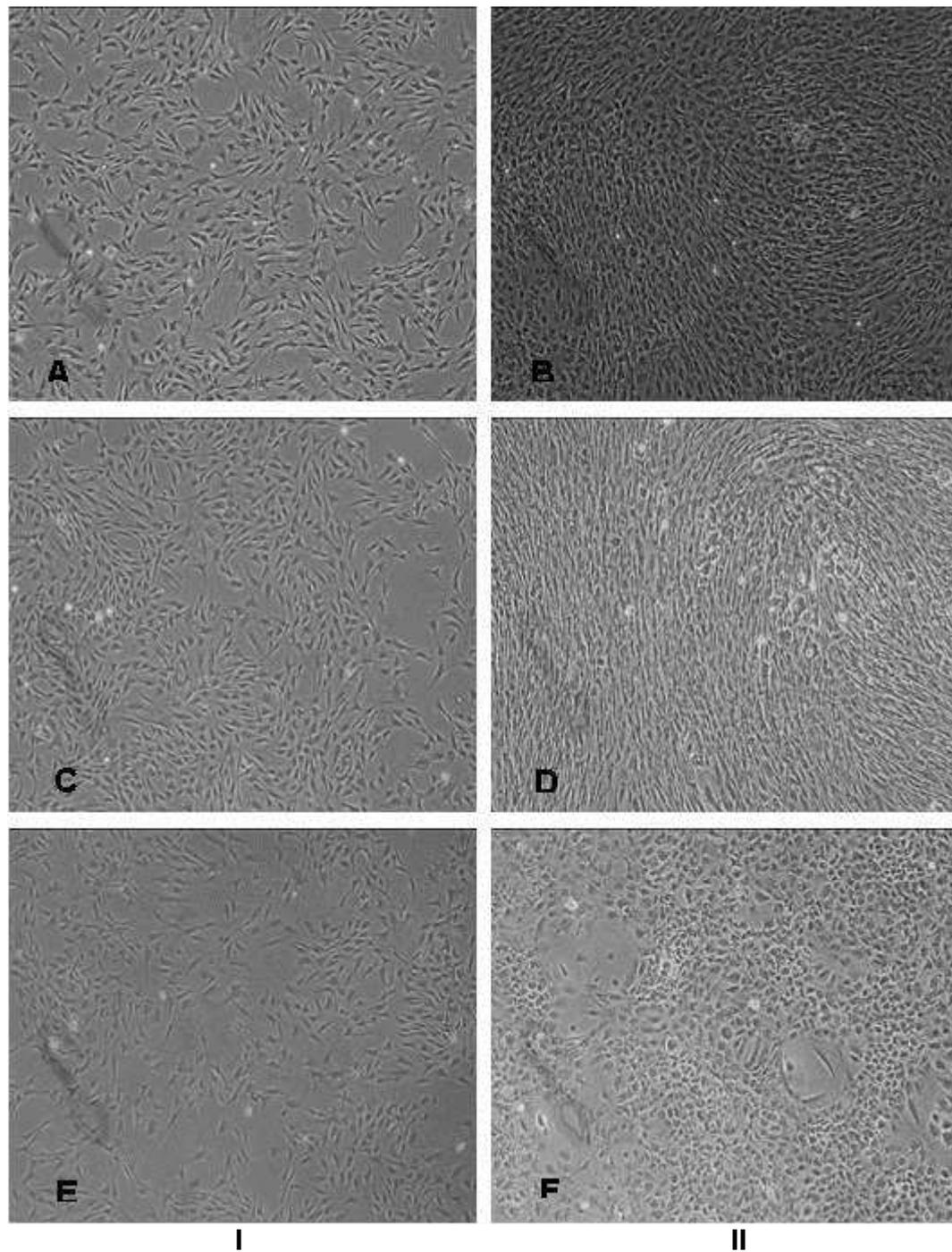


FIGURA 12: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica por diferentes protocolos. **A e B)** CTM (controle) cultivadas em IMDM suplementado com SFB 10%. **C e D)** CTM cultivadas em meio de diferenciação contendo HGF 20 ng/mL e FGF4 10ng/mL (método 1). **E e F)** CTM de MOR cultivadas em meio de diferenciação contendo dexametasona 0.5 μ M e HGF 50ng/mL e em meio de maturação contendo dexametasona 0.5 μ M e OSM 50ng/mL (método 4). Colunas I e II correspondem, respectivamente, aos dias 0 e 28, após início dos protocolos da diferenciação hepatogênica.

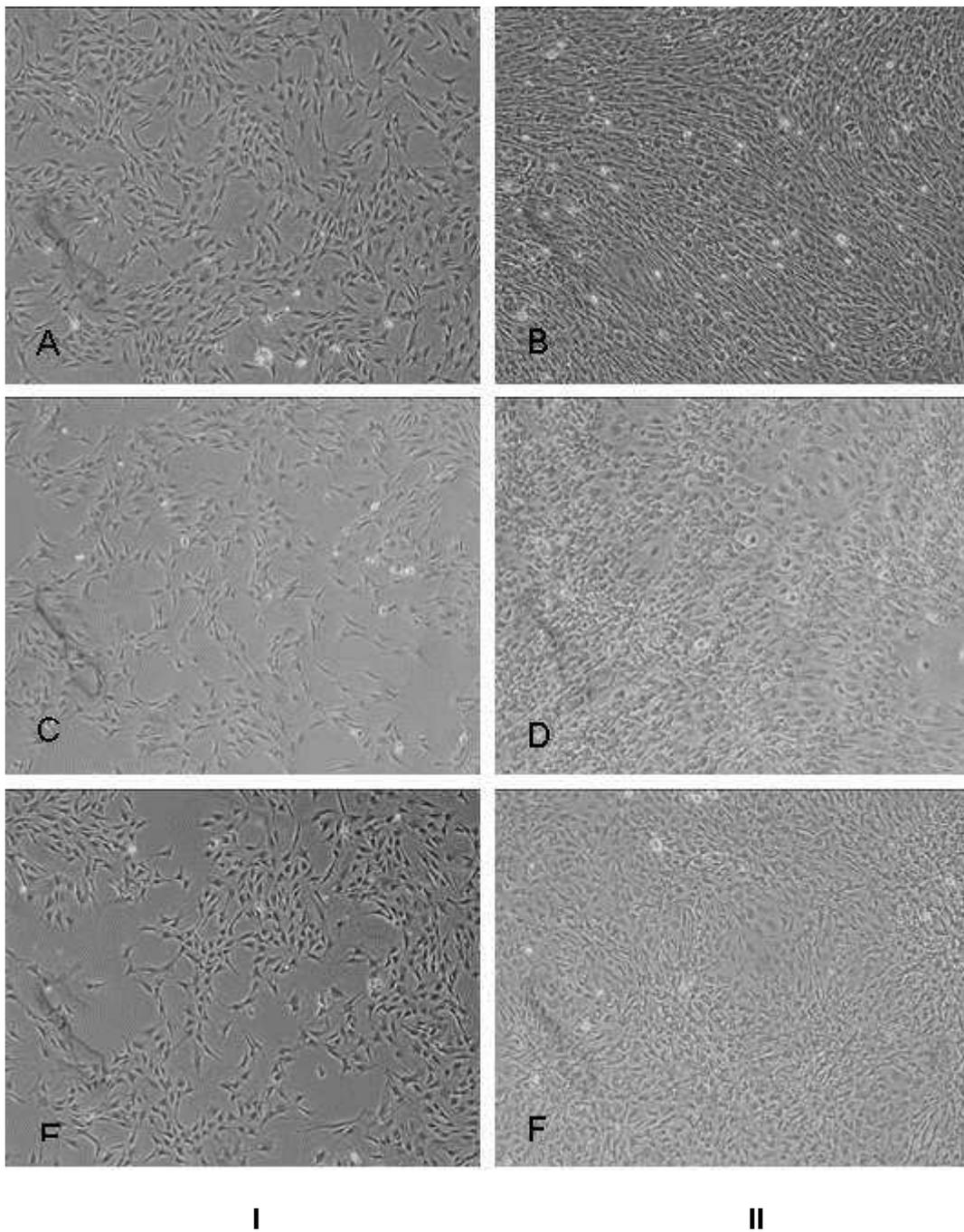


FIGURA 13: Observações morfológicas de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica. **A e B)** CTM de MOR (controle) cultivadas em IMDM suplementado com SFB 5% e SRC 5%. **C e D)** CTM de MOR cultivadas em IMDM suplementado com SRH 5%, HGF, dexametasona e OSM (método 5). **E e F)** CTM de MOR cultivadas em IMDM suplementado com meio condicionado de HepG2 (método 3). As colunas I e II correspondem, respectivamente, aos dias 0 e 28 após início dos protocolos de diferenciação hepatogênica.

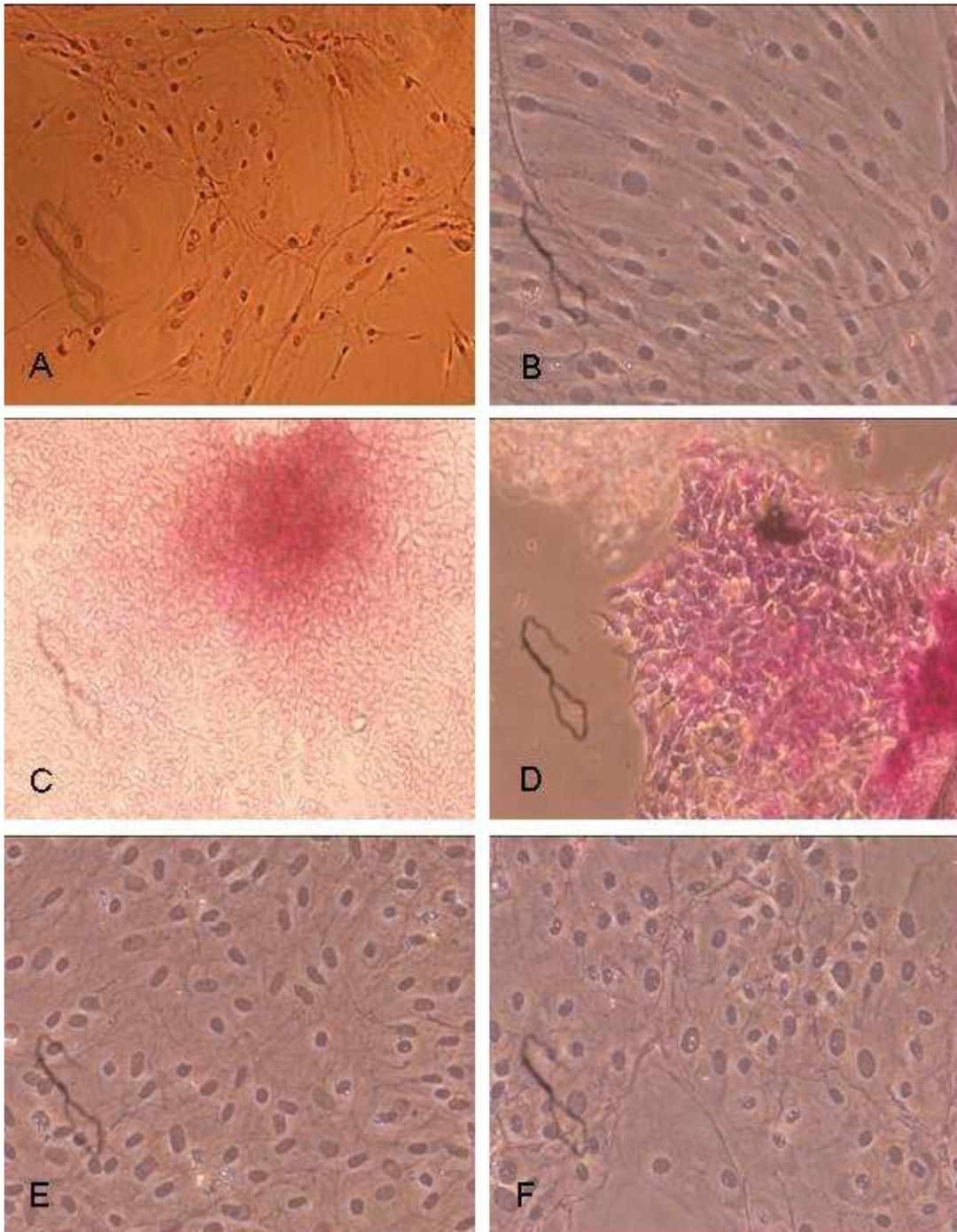


FIGURA 14: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica. **A)** CTM de MOR (controle) cultivadas em IMDM suplementado com SFB 10%. **B)** CTM de MOR cultivadas em IMDM suplementado com meio condicionado de HepG2 (método 3). **C e D)** Células HepG2 (controle positivo). **E)** CTM cultivadas em meio de diferenciação contendo HGF 20 ng/mL e FGF4 10ng/mL (método 1). **F)** CTM de MOR cultivadas em meio de diferenciação contendo dexametasona 0.5 μ M e HGF 50ng/mL e em meio de maturação contendo dexametasona 0.5 μ M e OSM 50ng/mL (método 4).

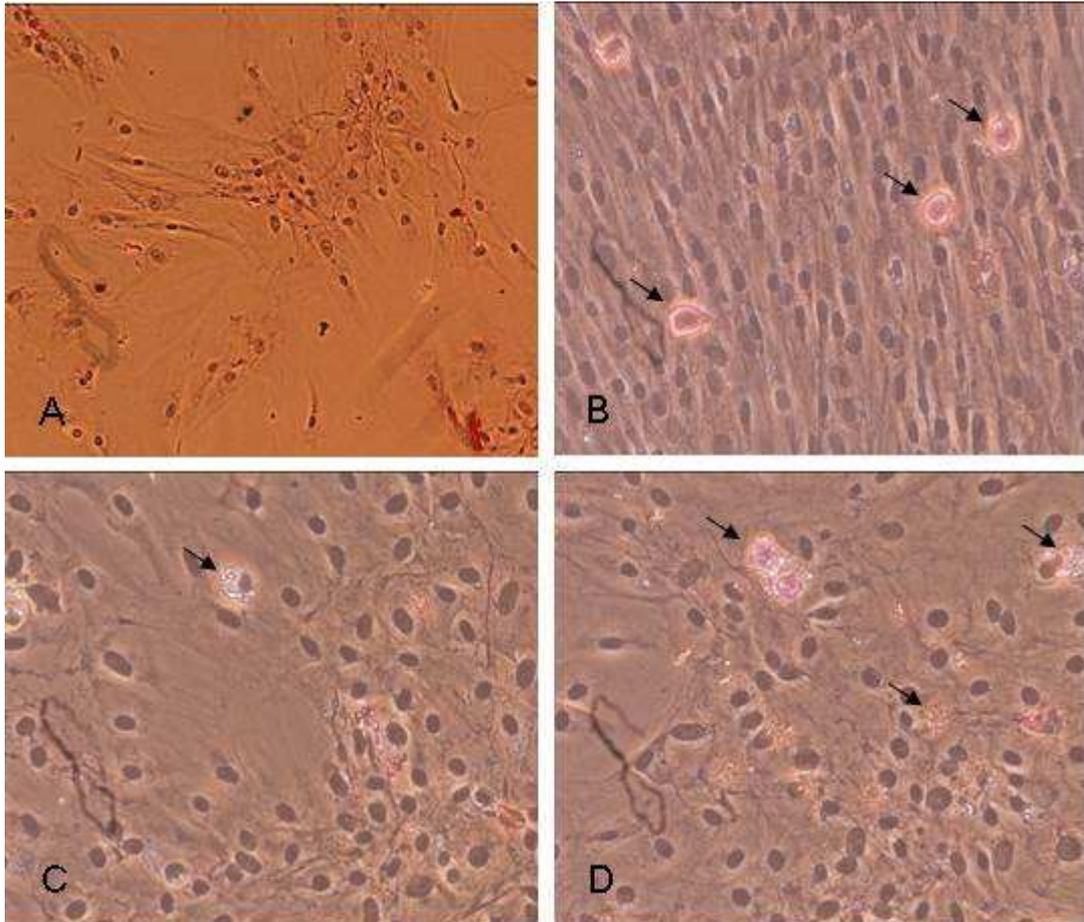


FIGURA 15: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOR após diferenciação hepatogênica. **A)** CTM de MOR (controle) cultivadas em IMDM suplementado com SFB 5% e SRC 5%. **B, C e D)** CTM de MOR cultivadas em IMDM suplementado com SRH 5%, HGF, dexametasona e OSM (método 5). As setas pretas indicam marcação de grânulos citosólicos de glicogênio por PAS.

4.2.2 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOGÊNICA DE CTM UTILIZANDO PROTOCOLOS DE TRÊS PASSOS

Os protocolos de três passos foram testados três vezes em CTM de MOH e uma vez em CTM de VCUH e as figuras para visualização dos resultados serão representadas pelas CTM de MOH. Neste momento, a diferenciação hepática foi avaliada quanto à capacidade das CTM diferenciadas de produzir e estocar glicogênio, confirmados por coloração de PAS (item 3.10 de Materiais e Métodos), de produzir ALB, que foi analisada por imunofluorescência (item 3.11 de Materiais e Métodos) e capacidade de expressão de genes específicos de hepatócitos que foi analisada por ensaios de PCR em tempo real (item 3.12 de Materiais e Métodos).

Para os testes com os protocolos de três passos fizemos algumas modificações nos procedimentos de cultivo celular em relação aos testes de um e dois passos. Durante todo o período da diferenciação, as trocas de meio ocorreram três vezes por semana e deixamos de suplementar os meios de diferenciação com os antibióticos penicilina e estreptomicina. No primeiro protocolo de três passos testado, CTM de VCUH foram tratadas com EGF, FGF2, HGF, nicotinamida, OSM e dexametasona que foram acrescentados aos meios de modo sequencial, semelhante aos estímulos temporais observados na embriogênese hepática (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 6). Com este tratamento, CTM de VCUH foram capazes de produzir e estocar glicogênio e, por análises de PCR em tempo real a expressão dos genes hepato-específicos ALB, HNF1 α , CYP3A4 e PEPCK aumentou em duas vezes em relação às células não diferenciadas (dados não mostrados). Com esses resultados promissores, este protocolo foi repetido por mais três vezes e outro protocolo de três passos foi testado, em paralelo, onde, CTM foram submetidas por sete dias a diferenciação endodérmica, seguida da diferenciação hepática como

descrito no método 6 (item 3.9 de Materiais e Métodos, método 7). O objetivo foi verificar se a diferenciação prévia em endoderme resultaria em um aumento nos estoques de glicogênio, aumento da síntese de ALB verificada por imunofluorescência e se haveria aumento na expressão de genes hepato-específicos, avaliado por PCR em tempo real. Os demais testes com os protocolos de três passos foram realizados utilizando somente CTM de MOH. Para simplificar, os resultados observados após os tratamentos pelos métodos 6 e 7, serão descritos juntos e serão referidos como métodos 6 e 7.

Em ambos os métodos 6 e 7, as células foram inicialmente privadas de SFB para sincronização do ciclo celular na fase G0 (Chen *et al.*, 2012) para que, após nova suplementação com SFB, as células movam juntas para as fases subsequentes do ciclo celular (Langan e Chou, 2011). No método 7, após os sete dias de diferenciação endodérmica com activina A (Figura 17B), as células não apresentaram mudança morfológica significativa em relação ao controle de células não diferenciadas (Figura 17A), que apresentaram morfologia fibroblastóide. Durante os sete dias de indução hepática, em ambos os métodos, na presença de HGF e FGF2, observamos a presença de células retraídas e arredondadas com perda da sua morfologia fibroblastóide, circundadas por células com morfologia fibroblastóide (Figuras 16A e B e 17C e D). Nesta fase, as mudanças morfológicas das CTM foram semelhantes em ambos os protocolos, porém, o grupo submetido ao método 6 (Figuras 16A e B) apresentou mais células retraídas e arredondadas, quando comparado ao grupo submetido ao método 7 (Figuras 17B e C). Sob a influência de OSM e dexametasona, durante o período de maturação hepática, observamos o aumento gradual do número de células retraídas e arredondadas bem como a presença abundante de grânulos citoplasmáticos (Figuras 16C, D e E e Figuras 17E e

F), os quais não foram observados nas células indiferenciadas (Figuras 16F e 17A). Nesta etapa, CTM tratadas com os métodos 6 e 7 mostraram comportamento semelhante. Essas observações foram semelhantes nos três experimentos de diferenciação hepática realizados com os protocolos 6 e 7 em paralelo.

As características morfológicas descritas acima estão de acordo com as mudanças morfológicas mostradas durante a diferenciação hepática de CTM em outros trabalhos (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). Ayatollahi e colaboradores (Ayatollahi *et al.*, 2011), após 7 dias de diferenciação hepática, descreveram uma cultura heterogênea com presença de células epiteliais com estruturas citoplasmáticas retraídas e células fibroblastóides. O aparecimento de células epiteliais foi de modo tempo-dependente e após 20 dias de diferenciação hepática, as células exibiram uma forma poligonal, semelhantes à de hepatócitos, com presença de grânulos citoplasmáticos.

CTM, submetidas aos protocolos 6 e 7, foram avaliadas quanto à sua capacidade de produzir e estocar glicogênio nos dias 14* e 21* (Figuras 5F e G) após início da fase de indução hepática. Células mostraram coloração positiva para grânulos de glicogênio citoplasmático após 14* dias da fase de indução hepática dos métodos 6 (Figura 18B) e 7 (Figura 18F) e não observamos diferenças quanto ao número de células positivas quando comparamos os dois protocolos. O número de células coradas aumentou após 21* dias de tratamento quando comparado ao dia 14*, em ambos os protocolos. Porém, com 21* dias de tratamento observamos maior intensidade de coloração no grupo tratado com o método 7 (Figuras 18G e H) quando comparado ao grupo tratado com o método 6 (Figuras 18C e D). O controle de células não diferenciadas não foram capazes de produzir e estocar glicogênio (Figura 18A) quando comparadas às células HepG2 (Figura 18B), utilizadas como controle positivo.

Essas observações foram semelhantes nos três experimentos de diferenciação hepática realizados com os métodos 6 e 7.

O método 6 de indução hepatogênica foi baseado no trabalho de Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2004a). Neste trabalho os autores observaram mudanças morfológicas das CTM diferenciadas semelhantes a nossas e também observaram aumento do número de células positivamente coradas para glicogênio de modo tempo dependente, porém, essas começaram a aparecer após 28 dias de indução enquanto nós observamos tais células após 14* dias de indução e a intensidade de coloração que eles observaram após 42 dias, foi semelhante a que observamos em 21* dias de indução pelo método 7. Ayatollahi e colaboradores (Ayatollahi *et al.*, 2011) também observaram células produtoras de glicogênio somente após 21 dias de indução hepática. Já Prasajak e Leeanansaksiri (Prasajak e Leeanansaksiri, 2013) observaram células produtoras de glicogênio, de modo tempo dependente, após 7, 12 e 18 dias de diferenciação hepática de CTM da geléia de Wharton em condições de hipóxia, além de terem observado pouca coloração no controle de células não diferenciadas. Essa produção precoce de glicogênio pelas CTM comparada a outros protocolos da literatura pode ser devido às condições de hipóxia utilizada por Prasajak e Leeanansaksiri. Em condições de hipóxia, o fator 1 induzível por hipóxia (HIF1) é expresso e passa a funcionar como o principal regulador do metabolismo celular, regulando a transcrição de genes que codificam para proteínas envolvidas no metabolismo da glicose e energético de forma geral, promovendo a síntese e acúmulo de glicogênio (Iida *et al.*, 2012; Prasajak e Leeanansaksiri, 2013). No nosso caso, a observação de células produtoras de glicogênio aos 14* dias de indução hepática, pode ser devido as nossas trocas de meio terem ocorrido três vezes por semana, praticamente dia sim dia não, enquanto que Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2004b) e

Ayatollahi e colaboradores (Ayatollahi *et al.*, 2011) realizaram suas trocas de meio duas vezes por semana, com intervalos entre as trocas de três a quatro dias. No fígado, durante o estado pós-prandial, com níveis altos de glicose e insulina, a síntese de glicogênio é estimulada aos seus níveis fisiológicos máximos (Winnick *et al.*, 2013), enquanto que a glicose é liberada a partir do catabolismo desse glicogênio para minimizar as mudanças na glicemia entre os estados alimentado e jejum (Moore *et al.*, 2012). Talvez as CTM cultivadas por Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2004b) e Ayatollahi e colaboradores (Ayatollahi *et al.*, 2011) estejam acumulando glicogênio tardiamente por estarem maior tempo em condições de cultura com menos glicose. Em outro trabalho, células produtoras de glicogênio também foram detectadas após 14 dias de indução hepática e os níveis máximos de células coradas foram observados após 21 dias de indução, semelhantes às nossas observações (Schwartz *et al.*, 2002). Porém, neste trabalho os autores não mencionaram a frequência das trocas de meio durante o período de diferenciação hepática.

A expressão de ALB pelas CTM submetidas aos métodos 6 e 7 foi analisada por imunofluorescência nos dias 14* e 21* após início da fase de indução hepática. Por essas análises, CTM mostraram capacidade de expressar ALB nos dias 14* e 21* (Figuras 19C, D, E e F). Não observamos diferença na intensidade de marcação entre os grupos tratados pelos métodos 6 e 7 e também não observamos diferença entre os dias 14* e 21*. As células controle, não diferenciadas, não mostraram capacidade de expressar ALB (Figura 19A) enquanto que o controle positivo de células HepG2 expressaram ALB (Figura 19B). Essas observações foram semelhantes nos três experimentos de diferenciação hepática realizados com os métodos 6 e 7.

Nossas observações quanto à expressão de ALB, por imunofluorescência, durante a diferenciação hepática de CTM estão de acordo com as observações da literatura. Por análise de imunofluorescência, Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2004b) observaram expressão de ALB após 14, 28 e 42 dias de diferenciação, e, assim como nós observamos, essa expressão não variou com o tempo da indução hepática. E por RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa), a expressão de ALB também ocorreu apenas a partir do 14º dia de indução. Lue e colaboradores (Lue *et al.*, 2010) analisaram a expressão de ALB durante o processo de diferenciação hepática de CTM de tecido adiposo humano por RT-PCR, western blot e imunofluorescência. Neste trabalho, por RT-PCR, o controle de células não diferenciadas expressou baixa quantidade de ALB, essa expressão aumentou após 14 dias de indução e se manteve estável até a quarta semana, mas, na quinta semana os níveis de expressão estavam próximos aos das células indiferenciadas. Pelas análises de western blot, a expressão de ALB aumentou até a terceira semana e começou a cair a partir da quarta semana. Já por imunofluorescência, ALB foi detectada da segunda até a quinta semana, sem observação de diferenças na intensidade de fluorescência entre as semanas de indução hepática. Talens-Visconti e colaboradores (Talens-Visconti *et al.*, 2006) observaram que a expressão de ALB analisada por PCR em tempo real aumenta após 7 dias de diferenciação hepática de CTM de tecido adiposo humano e que essa expressão cai pela metade na segunda semana. Porém, por imunohistoquímica, a ALB foi detectada após 14 dias e até uma maior expressão foi detectada após 21 dias de indução.

Em nosso trabalho, a expressão de AFP, cMet e ALB pelas CTM submetidas aos métodos 6 e 7 foi analisada por PCR em tempo real após a diferenciação

endodérmica e nos dias 7*, 14* e 21* após início da fase de indução hepática. Por essas análises não observamos aumento na expressão desses genes após a diferenciação hepática das CTM de MOH, pelos métodos 6 e 7 (Figura 20). Esta análise foi realizada em somente um experimento de diferenciação hepática, pois a expressão desses genes foi, na verdade, muito baixa nos outros testes realizados com os métodos 6 e 7.

A literatura recente aponta para o mesmo tipo de observação. Penteado e colaboradores (Penteado *et al.*, 2007) que utilizaram um protocolo semelhante ao método 6, utilizado por nós, para diferenciar CTM de MOH em hepatócitos, observaram mudanças morfológicas semelhantes, porém a expressão de ALB, CK 18 e α -fetoprotéina não sofreu alteração em relação às CTM indiferenciadas quando analisadas por imunofluorescência e por PCR em tempo real. Também com um protocolo semelhante ao do método 6, CTM de MOH e de tecido adiposo humano adquiriram marcadores hepáticos que incluem ALB, AFP, CYP2E1 e CYP3A4 (Talens-Visconti *et al.*, 2006), porém, sem aumento da expressão de CK-18 e CK-19. CK-18 e CK-19 são importantes marcadores de hepatócitos. Seo e colaboradores (Seo *et al.*, 2005) também concluíram terem diferenciado CTM de tecido adiposo humano com um protocolo de um passo contendo HGF, OSM e DMSO. Neste trabalho, os autores observaram expressão de ALB e AFP e secreção de uréia pelas células diferenciadas, porém também não observaram alteração na expressão de CK 18 e CK 19 entre as células diferenciadas e não diferenciadas.

As diferentes técnicas para isolar, cultivar e caracterizar CTM, em adição às diversas formas de diferenciá-las em hepatócitos e caracterizar esses hepatócitos, torna difícil qualquer comparação. De fato, trabalho muito recente (Hagmann *et al.*, 2013), mostra que, CTM de MOH cultivadas em quatro meios de cultivo diferentes

apresentam diferenças na proliferação celular, na distribuição dos marcadores de superfície e no potencial de diferenciação condrogênica. Além disso, observações feitas durante procedimentos padronizados de isolamento, expansão e diferenciação de CTM de MOH e de VCUH, no Centro de Pesquisa Experimental (IIEPAE), mostram que há também variação intrínseca entre os doadores de células. Essa diversidade dificulta também determinar um motivo para o nosso relativo insucesso na utilização desses protocolos, já que seguimos as boas práticas de laboratório para o cultivo celular e os reagentes utilizados para diferenciação hepática são de marcas descritas na literatura da área. A questão não é nova. Com objetivo de superar esse problema, Sancho-Bru e colaboradores (Sancho-Bru *et al.*, 2009) propuseram pela primeira vez métodos padronizados para validar tanto as CTM, como os hepatócitos obtidos de sua diferenciação, que serão utilizados na terapia celular de doenças hepáticas.

Uma outra questão refere-se à análise dos diferentes protocolos publicados e utilizados para diferenciação hepática, já que a escolha de tal protocolo parece ser crítica na característica das células finais. Para exemplificar esse problema, citamos o trabalho de Herencia e colaboradores (Herencia *et al.*, 2012) que diferenciaram CTM de MOH utilizando protocolo semelhante ao método 6 utilizado por nós. Neste trabalho os autores constataram que a dexametasona utilizada neste protocolo ativa a via Wnt/ β -catenina, cuja ativação está associada com hepatocarcinomas. Os hepatócitos obtidos por este protocolo tiveram o oncogene *c-myc* regulado positivamente, apresentaram proliferação celular anormal e expressão diferencial de 11 proteínas com expressão alterada em hepatocarcinomas em relação ao controle de células não diferenciadas e aos hepatócitos obtidos por outro protocolo onde esta via permaneceu inativada.

Comparando os protocolos de um, dois e três passos testados neste trabalho na tentativa de diferenciar CTM em hepatócitos, os protocolos de três passos, se mostraram ser mais eficientes em relação aos protocolos de um e dois passos.

Antibióticos são utilizados com frequência em meios de cultura para controlar a contaminação. Porém alguns estudos indicam que eles podem diminuir a taxa de proliferação e diferenciação de células-tronco. Cohen e colaboradores (Cohen *et al.*, 2006) avaliaram o efeito de gentamicina e o uso combinado de penicilina e estreptomicina durante a diferenciação de células-tronco embrionárias em pneumócitos do tipo II. O uso de antibióticos reduziu em até 60% os níveis do mRNA SPC (proteína C associada a surfactante pulmonar), um marcador funcional específico de pneumócitos do tipo II. Em adição, a taxa de crescimento dos corpos embriões foi reduzida em 40%. Efeitos tóxicos, também foram observados em culturas de CTM de MOH, onde, a gentamicina pareceu diminuir a proliferação e a eficiência de diferenciação osteogênica e condrogênica em relação às CTM cultivadas em meio sem gentamicina (Chang *et al.*, 2006). Em nosso estudo, os meios dos protocolos de um e dois passos ainda foram suplementados com os antibióticos estreptomicina e ampicilina, para controlar a contaminação, enquanto que os meios dos protocolos 6 e 7, foram isentados de antibióticos.

A diferenciação endodérmica aplicada no método 7, teve como objetivo verificar se esta etapa levaria a uma melhora no protocolo de diferenciação hepática seguinte representado, pelas etapas de diferenciação e maturação hepática presentes no método 6.

Waclawczyk e colaboradores (Waclawczyk *et al.*, 2010) e Lee e colaboradores (Lee *et al.*, 2012), aplicaram esse passo de diferenciação endodérmica para diferenciar CTM de SCUH e de tecido adiposo humano,

respectivamente, e a subsequente diferenciação hepática ocorreu de modo similar ao encontrado na literatura. Em ambos os trabalhos, CTM adquiriam marcadores específicos de hepatócitos, porém, não foi feita uma comparação entre protocolos com e sem o passo de diferenciação endodérmica, para verificar se este passo é vantajoso.

Quando avaliamos a diferenciação hepática, observamos uma vantagem de se aplicar a diferenciação endodérmica somente através das análises de PAS, onde claramente, as CTM submetidas ao método 7 mostraram possuir mais capacidade de produzir e estocar glicogênio. Porém, em nossa opinião, somente esse fato não é suficiente para considerarmos como vantajoso a inclusão desta etapa nos protocolos de diferenciação hepática de CTM, já que esta etapa torna o protocolo mais longo. Além disso, a medida do glicogênio não é quantitativa e aliada à diversidade de comportamento das linhagens mesenquimais, torna essa definição insuficiente. A análise de genes considerados essenciais para a função hepática por PCR em tempo real também tem se mostrado inadequada, dificultando ainda mais o estabelecimento de parâmetros reprodutíveis e confiáveis.

Alguns pesquisadores da atualidade acreditam que o uso de células-tronco induzidas (iPS) é a única maneira de fazer frente a essa questão. Num cenário ideal, células mesenquimais autólogas (de medula) ou fibroblastos (pele) seriam tratadas para indução de iPS, por métodos isentos de risco de tumorigênese, e depois submetidos aos protocolos de diferenciação (Awe *et al.*, 2013; Subba Rao *et al.*, 2013). A literatura recente começa a mostrar as publicações nessa área e mostram a riqueza de possibilidade e de problemas no desenvolvimento seguro e robusto de células similares a hepatócitos a partir de iPS humanas (Hannan *et al.*, 2013). Em adição, há a possibilidade de produção em larga escala de hepatócitos utilizados na

clínica e também como modelos em estudos de doenças hepáticas e de toxicidade de drogas (Vosough *et al.*, 2013).

Por outro lado, o cumprimento de etapas muito bem definidas e regulamentadas em nível internacional é necessário para validar a funcionalidade das células similares a hepatócitos produzidas. Em adição, a padronização de ensaios pré-clínicos mostrando qual o melhor tipo de célula e o número de células a ser transplantado é de extrema importância para levar o transplante de células-tronco ou de células similares a hepatócitos para uma terapia clinicamente útil.

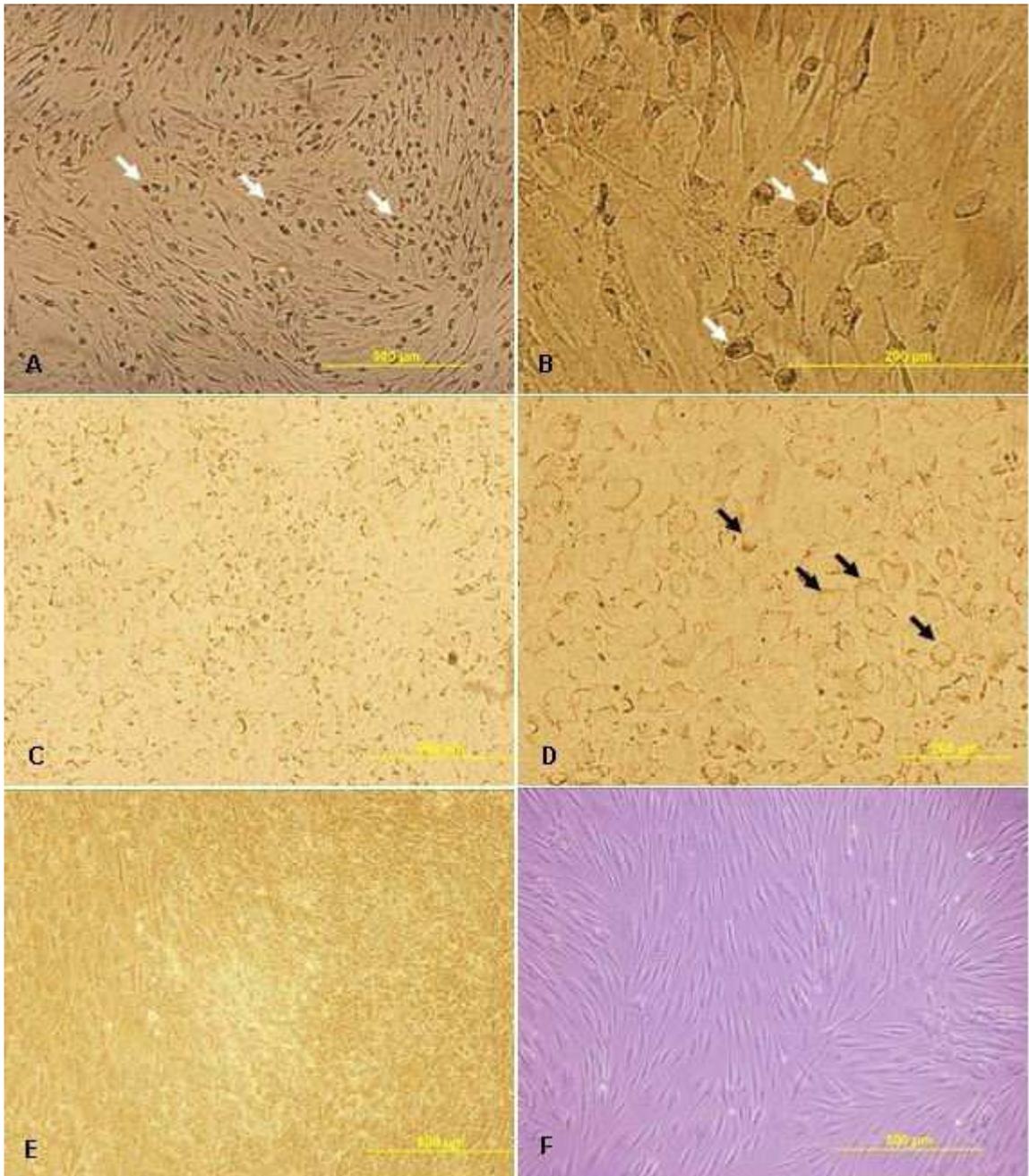


FIGURA 16: Observações morfológicas de CTM de MOH após diferenciação hepática pelo método 6. **A e B)** CTM de MOH após sete dias de diferenciação hepática em IMDM suplementado com HGF e FGF2 nos aumentos 10x e 40x respectivamente. **C e D)** CTM de MOH após 7 dias de maturação hepática cultivadas em IMDM suplementado OSM, dexametasona e ITS nos aumentos 10x e 20 respectivamente. **E)** CTM de MOH após 14 dias de maturação hepática. **F)** CTM de MOH (controle) cultivadas em LG-DMEM. As setas chamam a atenção para as mudanças morfológicas das células diferenciadas em relação ao controle de células não diferenciadas.

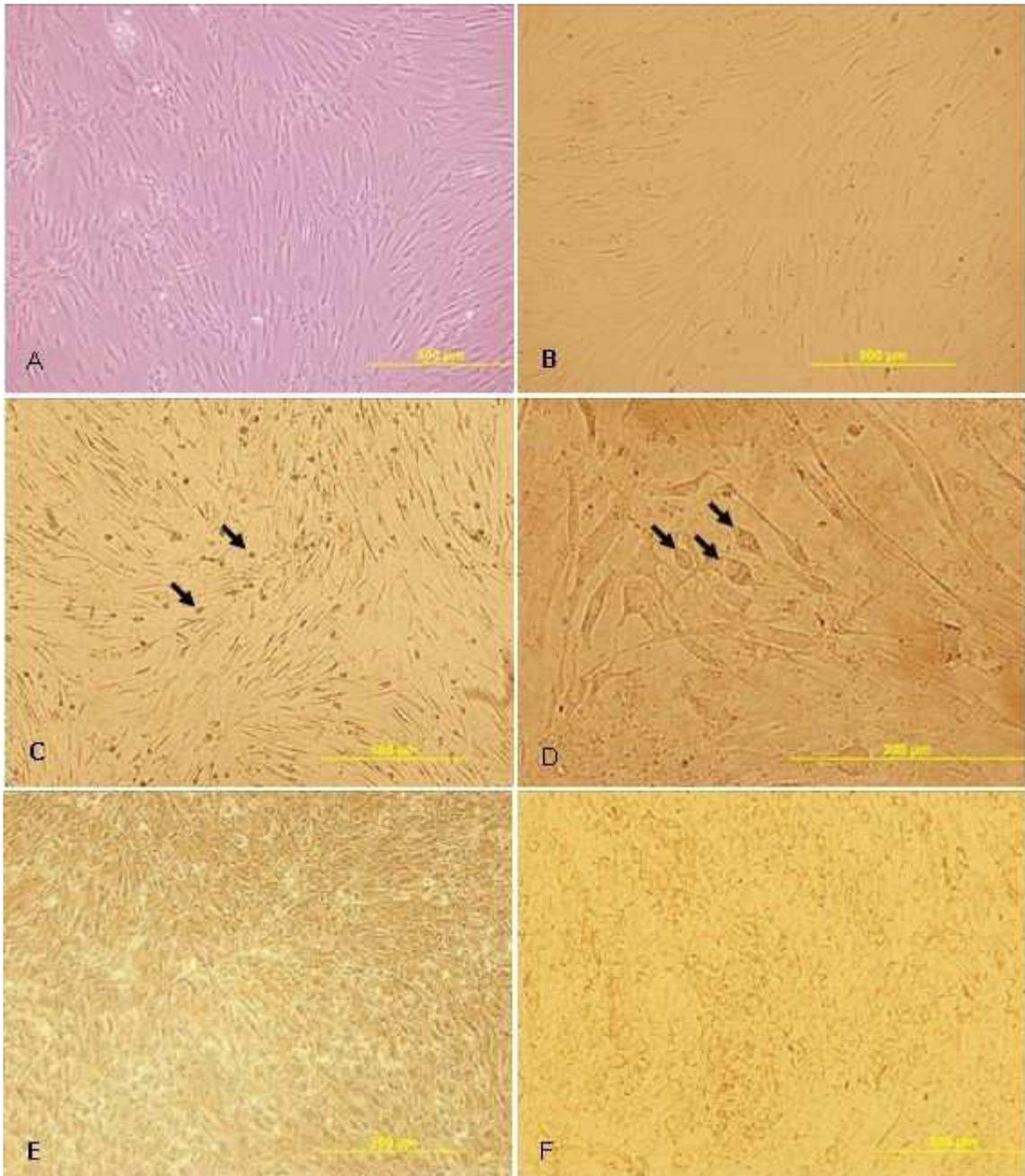


FIGURA 17: Observações morfológicas de CTM de MOH após diferenciação hepática pelo método 7. **A)** CTM de MOH (controle) cultivadas em LG-DMEM. **B)** CTM de MOH após sete dias de diferenciação endodérmica em IMDM suplementado com activina A. **C e D)** CTM de MOH após 7 dias de diferenciação hepática em IMDM suplementado com HGF e FGF2 nos aumentos 10x e 40x, respectivamente. **E)** CTM de MOH após 7 dias de maturação hepática cultivadas em IMDM suplementado OSM, dexametasona e ITS. **F)** CTM de MOH após 14 dias de maturação hepática. As setas chamam a atenção para as mudanças morfológicas das células diferenciadas em relação ao controle de células não diferenciadas.

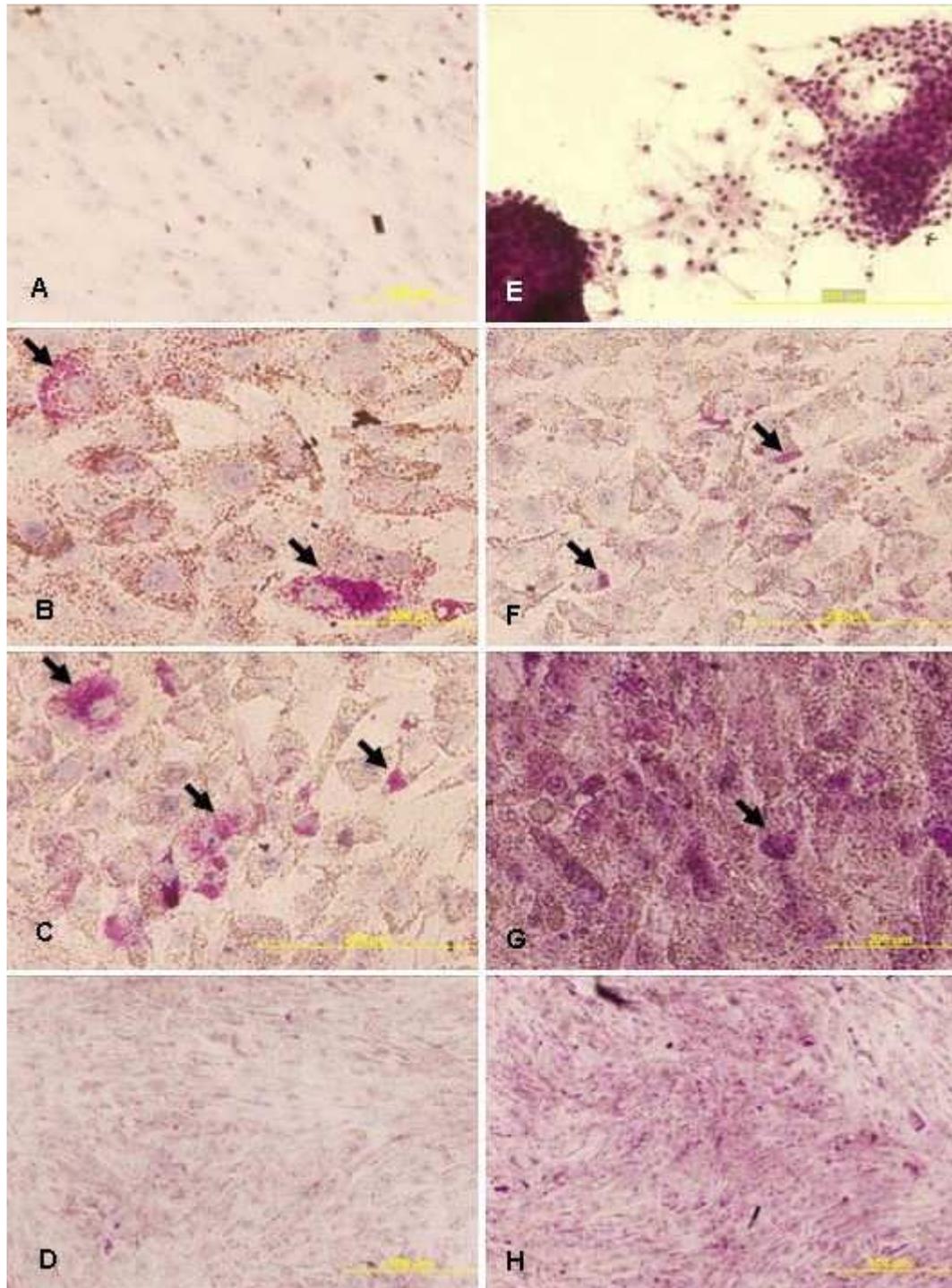


FIGURA 18: Coloração de glicogênio por PAS de CTM de MOH após 14* e 21* dias de diferenciação hepatogênica pelos métodos 6 e 7. **A)** CTM de MOH (controle) cultivadas em LG-DMEM. **B, C e D)** CTM de MOH nos dias 14* (**B**) e 21* (**C e D**), após início da diferenciação hepatogênica pelo método 6. **E)** HepG2 coradas por PAS para controle positivo. **F, G e H)** CTM de MOH nos dias 14* (**F**) e 21* (**G e H**) após início da diferenciação hepatogênica pelo método 7. Setas apontam para grânulos de glicogênio corados.

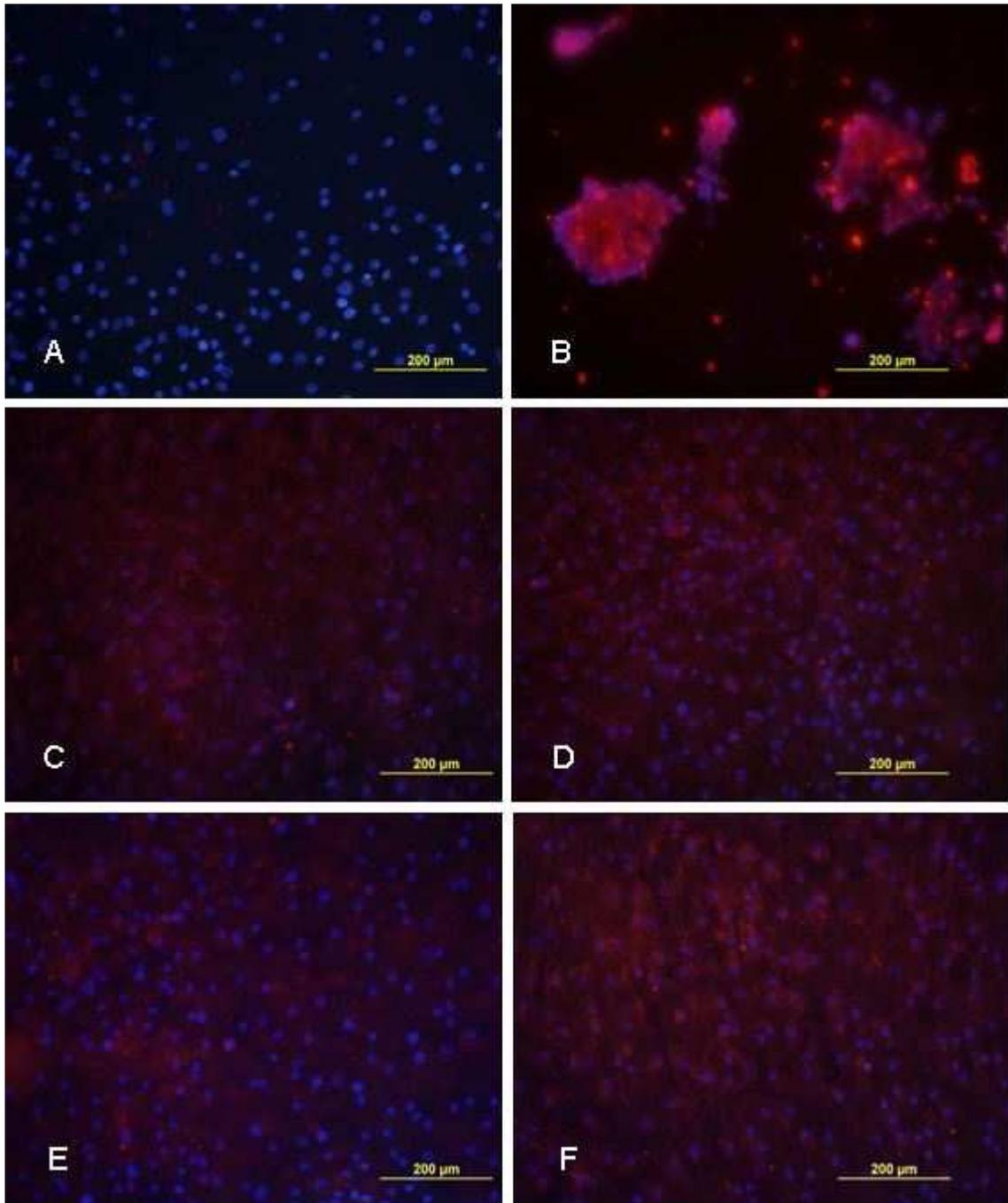


FIGURA 19: Análise da expressão de albumina por imunofluorescência após a diferenciação hepática de CTM de MOH pelos métodos 6 e 7. **A)** CTM de MOH (controle) cultivadas em LG-DMEM. **B)** Expressão de ALB por Células HepG2 para controle positivo. **C e E)** CTM de MOH nos dias 14* (**C**) e 21* (**E**), após início da diferenciação hepatogênica pelo método 6. **D e F)** CTM de MOH nos dias 14* (**D**) e 21* (**F**) após início da diferenciação hepatogênica pelo método 7.

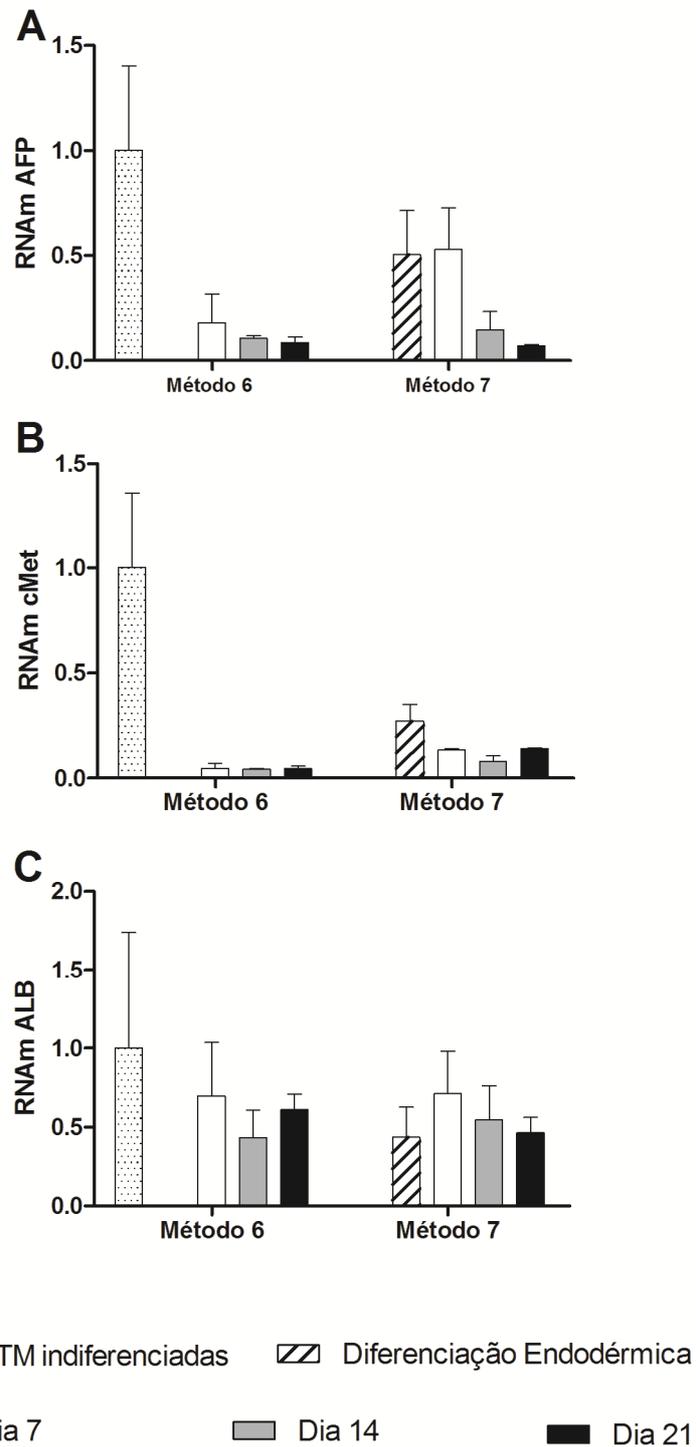


FIGURA 20: Análise da expressão gênica de APP, cMet e ALB por PCR em tempo real durante a diferenciação hepática de CTM de MOH pelos métodos 6 e 7. **(A)** AFP (α -fetoproteína). **(B)** cMet (receptor de HGF). **(C)** ALB (albumina). Expressão normalizada pelo gene GAPDH e expressos como número de vezes em relação ao controle – CTM indiferenciadas (*fold-change*).

4.3 – PADRONIZAÇÃO DO MODELO ANIMAL DE INJÚRIA HEPÁTICA INDUZIDA POR DMN E TRANSPLANTE DE CTM DE VCUH

O modelo de fibrose hepática induzida por DMN tem sido utilizado tanto para caracterizar a evolução da fibrose após injúria hepática (Hata *et al.*, 2002) como para testar novas terapias para o tratamento de doenças hepáticas (Choi *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2005). No presente trabalho, nossa proposta foi padronizar um modelo de injúria hepática induzida por DMN para realização de testes de terapia baseada em CTM.

Em um primeiro momento, optamos por estabelecer um modelo experimental baseado naquele desenvolvido por Ozawa e colaboradores (Ozawa *et al.*, 2006), modelo no qual, ratos machos da raça Sprague-Dawley foram tratados com DMN por três semanas com três injeções consecutivas por semana na dose 10 µg/g de peso do animal. Na quarta semana os animais foram submetidos à hepatectomia parcial e o tratamento com DMN continuou por mais duas semanas. Em outro estudo, ratas Wistar também foram tratadas com três injeções ip consecutivas por semana, mas por seis semanas de DMN 10 µg/g. Os níveis séricos de BT e ALT e a fibrose hepática se mostraram mais elevados nos animais eutanasiados vinte dias após o término do tratamento com DMN quando comparados aos animais eutanasiados após dez dias do término do tratamento, indicando ocorrer lesão hepática progressiva mesmo após o término do tratamento de DMN (Zhao *et al.*, 2005). Também tratados com três injeções ip consecutivas por semana de DMN 10 µg/g, porém durante quatro semanas, os níveis séricos de ALT, AST, FA e BT de ratos Sprague-Dawley aumentaram com o tempo de tratamento com DMN (Saha *et al.*, 2007). A fibrose hepática foi observada em torno da tríade portal a qual se estendia ligando diferentes

tríades portais, enquanto que os animais controle mantinham a arquitetura hepática intacta.

Num experimento piloto conduzido no Biotério do IQ-USP, 6 ratos Wistar com peso em torno de 150 gramas, foram divididos em grupo controle (n = 3) pois não recebeu tratamento para indução de fibrose hepática e grupo experimental (n=3) que recebeu três injeções consecutivas por semana durante três semanas na dose de DMN 10 µg/g de peso do animal. Na quarta semana realizamos a hepatectomia de 30% e o tratamento continuou por mais uma semana e não duas semanas, como planejado, pois, neste experimento piloto, todos os ratos do grupo experimental morreram na quinta semana, antes do término do experimento (dados não mostrados).

O desenho experimental utilizando uma droga hepatotóxica, inclusive a DMN, pode variar conforme o tempo de indução, concentração da dose aplicada, combinação com hepatectomia, além do tipo de animal e linhagem empregados (Hyon *et al.*, 2011; Ying *et al.*, 1980).

Após observar os resultados acima descritos, buscamos estabelecer a melhor dosagem de DMN através da avaliação dose-resposta, onde os ratos Wistar foram submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de DMN, incluindo a dosagem indicada por (Ozawa *et al.*, 2006) (grupo G4) e também dosagens mais diluídas (grupo G3). Decidimos verificar também o efeito da hepatectomia em ratos tratados (grupos G5 e G6) ou não com DMN (grupo G2) e conseqüentemente escolher entre o modelo misto (DMN/hepatectomia) e o modelo DMN. O efeito da DMN e da hepatectomia foi avaliado através de parâmetros bioquímicos e através de histologia por coloração de HE e tricromo de Masson.

Pelas análises macroscópicas, as alterações no aspecto geral do fígado foram dose-dependentes (Figura 21). O fígado dos ratos do grupo G4 (DMN 10 µg/g) (Figuras 21E e F) apresentou inchaço dos lóbulos hepáticos, presença de regiões amareladas e mudança na textura do fígado com maior rigidez em relação ao grupo controle (Figuras 21A e B). Já o fígado dos ratos do grupo G3 (Figuras 21C e D) apresentou inchaço discreto e textura com pouca alteração em relação ao grupo controle e não foi observada nenhuma região do fígado com pontos amarelados. As alterações observadas nos grupos G5 e G6 (dados não mostrados) foram semelhantes às alterações observadas nos grupos G3 e G4, respectivamente, portanto por análise visual não detectamos efeito da hepatectomia. Este inchaço do fígado observado por nós pode ser devido a edema, o qual está associado à inflamação aguda observada nos estágios iniciais da fibrose hepática (George *et al.*, 2001).

Esse mesmo padrão de toxicidade dose-dependente também foi observado nas análises histológicas. Na coloração com HE, o grupo controle apresentou arquitetura hepática normal, com os hepatócitos alinhados aos sinusóides convergindo para a veia centrolobular (Figuras 21A e B). Nos grupos G4 (apenas DMN 10 µg/g) e G6 (DMN 10 µg/g/hepatectomia), observamos alteração da arquitetura normal do parênquima hepático com presença de infiltrado inflamatório (Figuras 22E e F). Na coloração de tricromo de Masson, observamos a deposição aumentada de MEC (Figuras 23E e F) em relação ao controle (Figura 21A). Porém, não foram observados nódulos regenerativos e pseudolobulização, típicos de fibrose hepática mais avançada. Já nos grupos G3 e G5, observamos pontos de tumefação celular, que corresponde ao aumento de água e sódio no citoplasma celular, deixando espaços vazios em torno do núcleo e indicando os primeiros sinais de lesão celular

(Figuras 22C e D). A tumefação celular muda o padrão de coloração das células quando analisadas por HE. Porém, não observamos alteração significativa na arquitetura do parênquima hepático, com aumento da deposição de MEC somente à volta dos vasos sanguíneos (Figuras 22C e D e 22C e D). Tampouco foi observada alteração nos cortes histológicos do grupo G2, apenas submetido à PBSA/hepatectomia (Figura 22B e 22B). Esses resultados mostram um efeito dose-dependente da DMN e que a hepatectomia não altera este efeito.

Apesar das alterações histológicas evidentes, somente os níveis séricos de FA foram alterados de modo significativo após tratamento com DMN (Figura 24A) e apenas nos grupos G4 e G6. Não houve diferença nas concentrações de FA com a hepatectomia associada ao tratamento. Já os níveis séricos de ALT mostraram-se aumentados de modo significativo somente no grupo G2 (Figura 24B). A DMN com ou sem hepatectomia associada não alterou os níveis séricos de ALT. Por outro lado, os níveis séricos de AST aumentaram de modo significativo somente nos grupos G2 e G6, sugerindo a presença de um efeito causado pela hepatectomia *per se*. Os níveis séricos de BT variaram muito num mesmo grupo e, assim, apesar da média aumentada nos grupos G4 e G6, não foram observados diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle (Figura 24C). O modelo de injúria hepática induzida por DMN desenvolvido para este projeto mostra as alterações macroscópicas (Ozawa *et al.*, 2006), histológicas (Choi *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2010) e aumento dos níveis séricos de FA (Shin *et al.*, 2010) observados na literatura, mas a hepatectomia não parece contribuir para o agravamento das lesões. De fato, a hepatectomia parcial é um bom modelo para estudos da regeneração hepática. Ratos submetidos à hepatectomia de 70% apresentam a regeneração completa do fígado após sete dias (Tannuri *et al.*, 2007) e os níveis séricos que são alterados após 24

horas, se aproximam dos valores normais após sete dias da hepatectomia de 95% (He *et al.*, 2003). Esta rápida regeneração, também foi observada em nossos experimentos de hepatectomia parcial, apesar das alterações nos níveis séricos terem sido observadas no grupo G2, após duas semanas da hepatectomia. Observamos grande taxa de mortalidade no modelo misto, os grupos G5 e G6 tiveram taxa de mortalidade de 60% enquanto que o grupo G4 teve taxa de mortalidade de 14%. Finalmente, pelo fato da hepatectomia não agravar a injúria provocada por DMN e ainda causar grande taxa de mortalidade, concluímos que o melhor modelo de injúria hepática crônica é o de aplicação somente de DMN, como aplicado no grupo G4, para testar o efeito do transplante de CTM. Que teve efeito avaliado pelas colorações de HE e tricromo de Masson e pelos níveis séricos de FA.

Em nosso ensaio pré-clínico de terapia celular, ratos Wistar foram tratados com 3 injeções consecutivas de DMN por quatro semanas e, na quinta semana, CTM de VCUH na dose de 1×10^7 células, foram injetadas por via da veia caudal, seguido da eutanásia dos ratos na sexta semana (Figura 6C) para coleta dos dados. As análises histológicas mostram que, após o transplante de CTM, não houve diferença na intensidade de fibrose entre os grupos G8 (grupo placebo) e G9 (transplante de CTM) (Figuras 25A, B, C, D e E), o grupo G9 não adquiriu maior peso quando comparado ao grupo G8 (Figura 25G) e por fim, embora os valores de FA tenham sido menores no G9, essa não foi estatisticamente significativamente quando comparado ao grupo G8 (Figura 25H).

Em alguns estudos, as CTM têm mostrado a capacidade de migrar e incorporar-se no tecido hepático danificado, contribuindo para o seu reparo. O primeiro estudo mostrando essa habilidade de CTM extra-hepáticas surgiu quando Petersen e colaboradores (Petersen *et al.*, 1999) injetaram CTM de MO de ratos

machos em ratas tratadas com acetilaminofluoreno, um bloqueador da proliferação de hepatócitos, e CCl₄ para induzir injúria hepática. Os autores observaram que parte dos hepatócitos regenerados eram positivos para o cromossomo Y, sugerindo que eles foram derivados das células do doador.

A partir daí, muitos grupos de pesquisa buscaram mostrar o potencial terapêutico das CTM, provenientes de diversas fontes, na medicina regenerativa para o fígado. Porém, este achado ainda é controverso e para verificar o efeito do transplante de CTM de SCUH, Jung e colaboradores (Jung *et al.*, 2009) injetaram 10⁶ células por via da veia caudal em ratos com injúria hepática induzida com 3 injeções ip semanais de CCl₄, na dose 1 mL/kg, por 8 semanas. Os ratos foram eutanasiados 1, 2, 3, e 4 semanas após o transplante de células. Neste modelo, os níveis séricos de AST e ALT melhoraram de modo significativo somente a partir da segunda semana do transplante e uma melhora significativa do grau de fibrose e dos níveis séricos de FA só foram observados na quarta semana. Já em modelos de cirrose hepática severa, com ratas Wistar tratadas com 3 injeções ip de CCl₄ por semana, durante 15 semanas, na dose de 0,05 mL/kg, associado com dieta líquida alcoólica, o transplante de CTM parece não melhorar os parâmetros bioquímicos e o grau de fibrose hepática em relação ao grupo placebo, avaliados 2 meses após o transplante (Carvalho *et al.*, 2008; Mannheimer *et al.*, 2011). Nesses estudos, 5 doses de 3 x 10⁷ CTM foram injetadas pela via da veia caudal durante o período de indução da injúria hepática (Quintanilha *et al.*, 2008) e uma dose única de 1 x 10⁷ CTM foi injetada via veia porta ao final do tratamento com CCl₄ (Carvalho *et al.*, 2008). Por fim, foi avaliado também o efeito da injeção na veia portal de 1,6 x 10⁷ CTM isoladas de ratas cirróticas e aplicadas ao final do protocolo de injúria hepática. Os resultados mais recentes, obtidos nos modelos mais crônicos e graves sugerem que o transplante clínico de

células autólogas em pacientes com doença hepática pode não exercer os efeitos desejados.

O fato de não termos observado efeito positivo após o transplante de CTM pode ser devido a algumas questões. Primeiro, em nosso delineamento experimental, a eutanásia dos ratos aconteceu uma semana após o transplante com as células. Em estudos muito recentes, embora tenha sido observado efeito positivo da terapia de CTM de MOR em um modelo de injúria hepática induzida por CCl₄, 7 dias após ter ocorrido o transplante (Cho *et al.*, 2012), alguns trabalhos observam o efeito somente várias semanas após a data do transplante (Nasir *et al.*, 2013), e ainda, esse efeito parece ser progressivo, com uma maior melhora dos parâmetros analisados 4 semanas após o transplante quando comparados com os dados obtidos após 2 semanas do transplante (Ali e Masoud, 2012).

Após a indução de injúria hepática, como parte do processo da resposta inflamatória e regeneração tecidual, ocorre a liberação de citocinas que parecem facilitar a migração de CTM para o local da injúria e conseqüente repopulação do fígado submetido à injúria (Chen *et al.*, 2010). O nosso modelo com DMN caracteriza os estágios iniciais de fibrose hepática, com aumento na deposição de colágeno, porém sem presença de pseudolocalização, e pode ser que neste modelo não esteja havendo a liberação de quantidade suficiente de citocinas para que ocorra a migração de CTM para o local do dano tecidual. Este pode ter sido o segundo motivo para não termos verificado o efeito positivo após terapia com as CTM. Porém, vale lembrar que observamos uma queda nos valores de FA após o tratamento com CTM, que, embora não seja significativa, representa uma tendência. O grupo de Popp (Popp *et al.*, 2007) também não identificou uma incorporação de CTM de MO, após transplante em um modelo suave, em camundongos, de injúria hepática

induzido com duas injeções de CCl_4 na dose 0,6 mL/kg. De fato, para avaliar o efeito do transplante de CTM, o modelo de DMN estabelecido por Zhao e colaboradores em ratas Wistar foi de 6 semanas, com dose de DMN e números de injeções semanais iguais ao do nosso protocolo. Porém, neste trabalho foi verificado uma taxa de mortalidade de 90% no grupo placebo e de 40% no grupo tratado com CTM (Zhao *et al.*, 2005), indicando a necessidade de validação do modelo. O mesmo padrão variável de resultados foi obtido também por outros pesquisadores brasileiros, aplicando CCl_4 em ratos e em camundongos (Regina Goldenberg e Grazielle Suhett Dias, dados não publicado). Assim, o estudo aqui desenvolvido, apesar de confirmar, de modo geral, os achados da literatura, mostra que, para a sua utilização como modelo pré-clínico reproduzível e consistente, será necessária a continuidade dos experimentos ou alternativamente, o teste de novas drogas e o desenvolvimento de outros modelos de insuficiência hepática mais adequados.

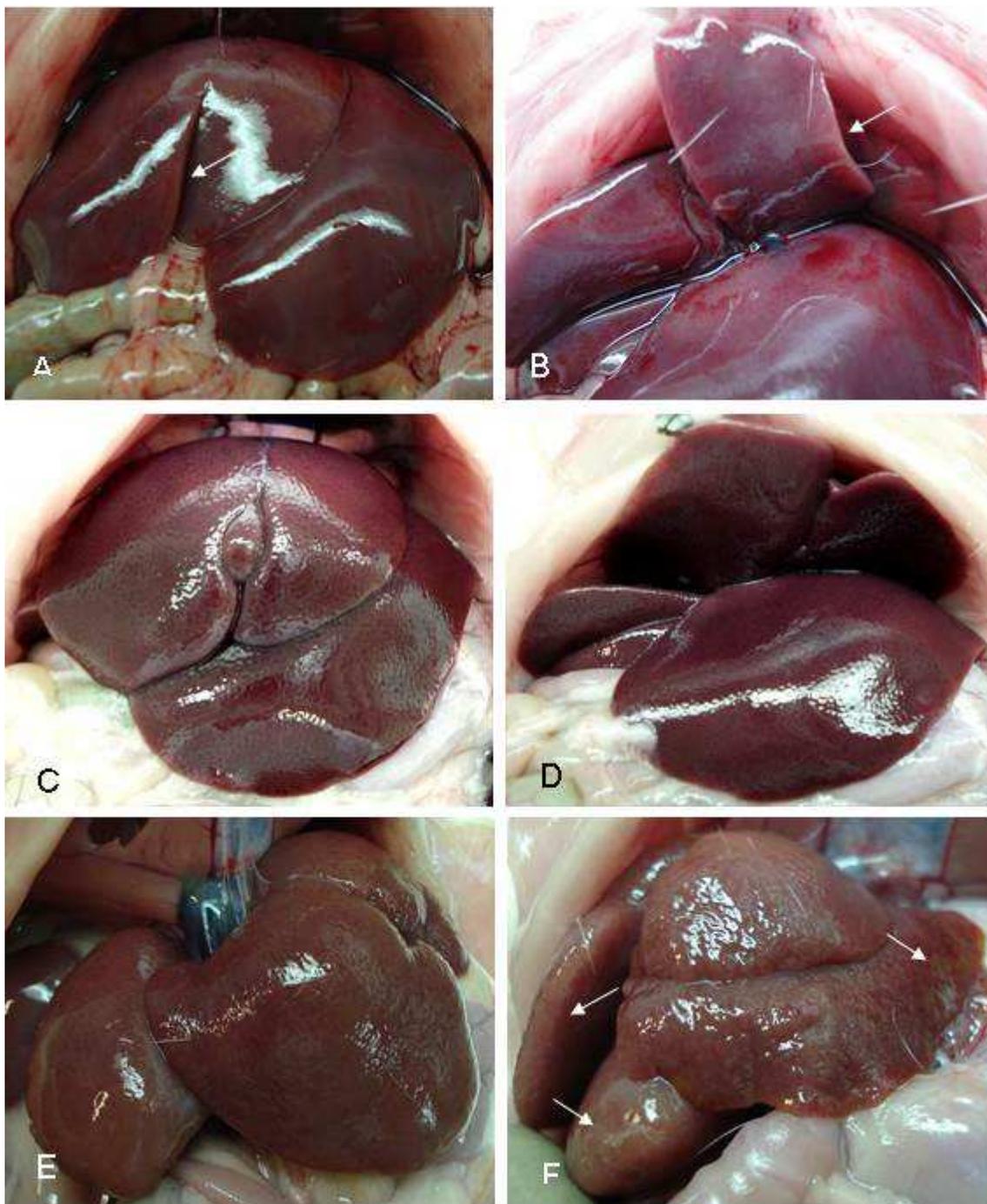


FIGURA 21: Análise macroscópica do fígado de ratos Wistar controle e tratados com DMN. **A e B)** Ratos tratados com PBSA (grupo controle). **C e D)** Ratos tratados com DMN na dose de 5 µg/g de peso animal (grupo G3). **E e F)** Ratos tratados com DMN na dose de 10 µg/g de peso do animal (grupo G4). As setas chamam a atenção para o inchaço dos lóbulos hepáticos e presença de regiões amareladas dos ratos do grupo tratado com DMN 10 µg/g quando comparados com os ratos dos grupos DMN 5 µg/g e controle.

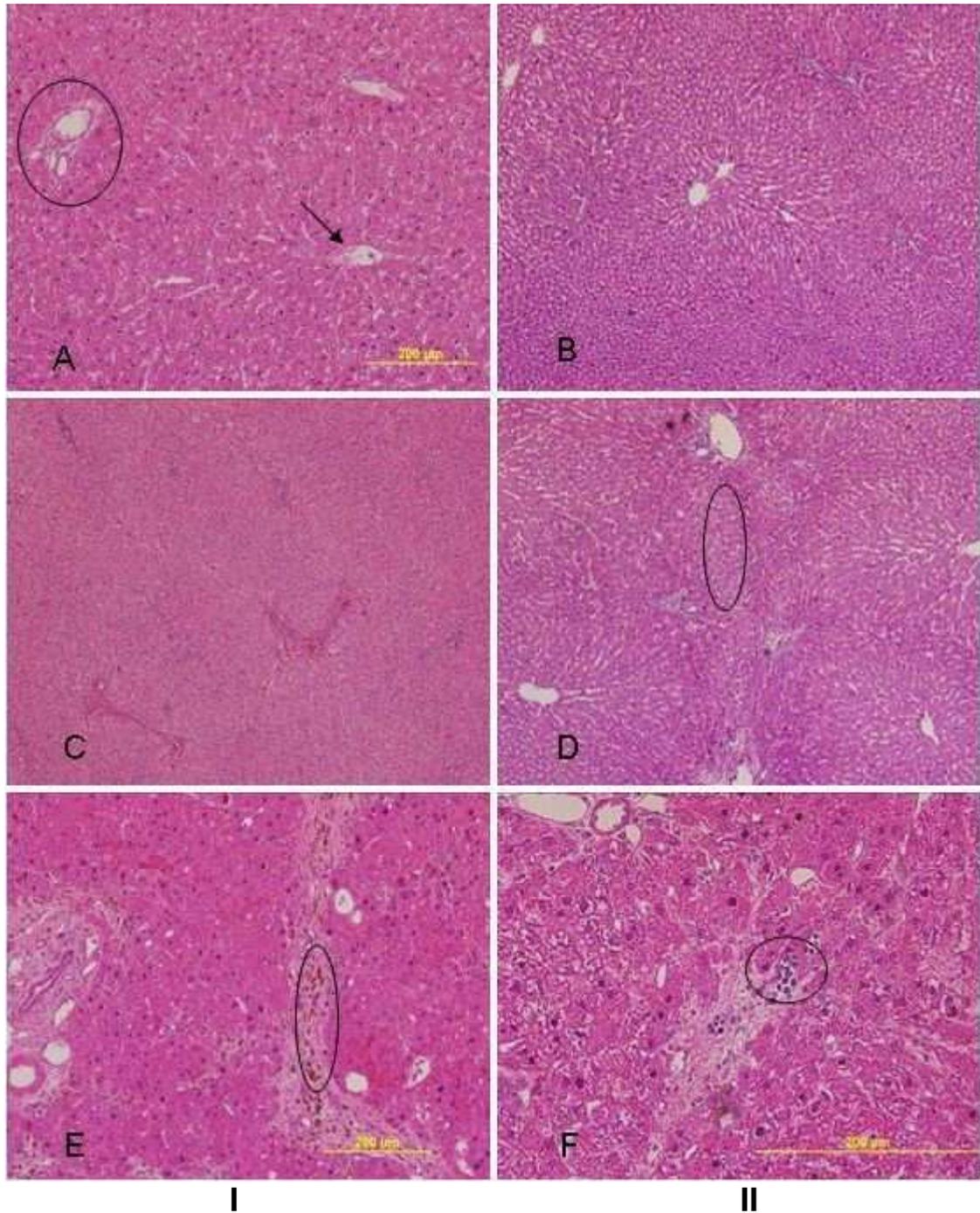


FIGURA 22: Análise histológica por coloração por HE do fígado de ratos tratados com DMN. Colunas I e II representam os ratos não submetidos e submetidos à hepatectomia, respectivamente. **A)** Grupo controle evidenciando aspectos normais, o círculo e a seta evidenciam o espaço porta e a centrolobular, respectivamente. **B)** Grupo G2, evidenciando nenhuma alteração em relação ao controle. **C e D)** Grupos G3 e G5, respectivamente, mostrando pouca alteração no parênquima hepático em relação ao controle. Círculo aponta para área de tumefação. **E e F)** Grupos G4 e G6, respectivamente, mostrando alteração no parênquima hepático em relação ao controle com presença de infiltrado inflamatório evidenciado pelos círculos.

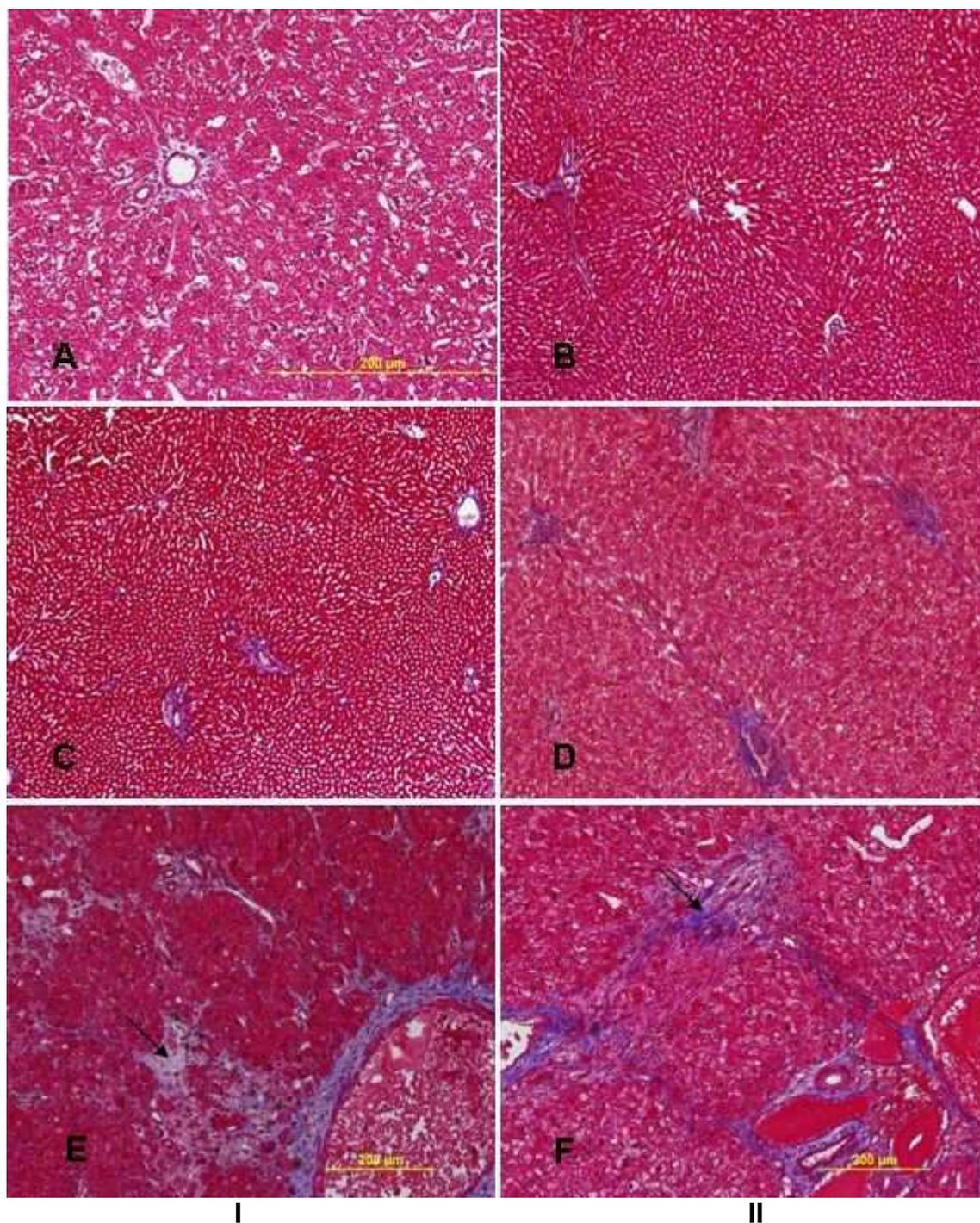


FIGURA 23: Análise histológica por coloração por tricromo de Masson do fígado de ratos tratados com DMN. Colunas I e II representam os ratos não submetidos e submetidos à hepatectomia, respectivamente. **A)** Grupo controle mostrando deposição normal de colágeno perivascular. **B)** Grupo G2, mostrando padrão de deposição de MEC semelhante ao grupo controle. **C e D)** Grupos G3 e G5, mostrando aumento de deposição de MEC perivascular em relação ao controle. **E e F)** Grupos G4 e G6, mostrando alteração no parênquima hepático em relação ao controle deposição anormal de colágeno (setas) em relação ao controle.

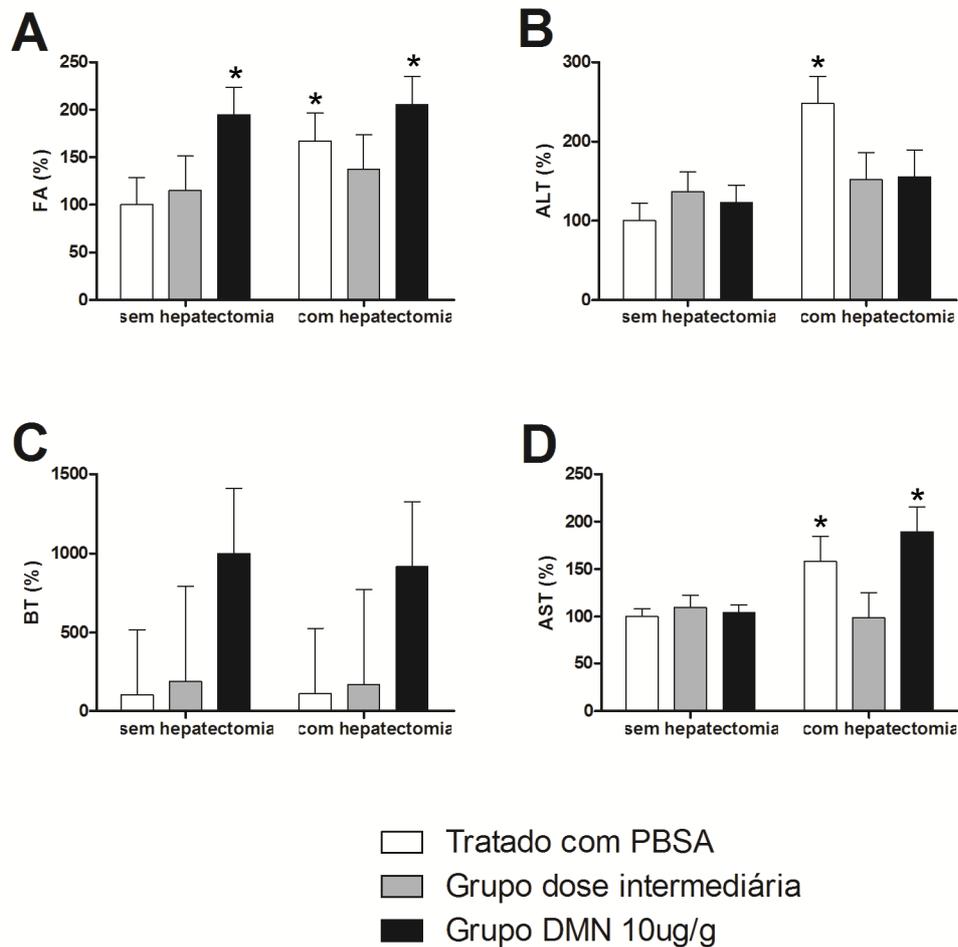


FIGURA 24: Parâmetros bioquímicos dos ratos tratados com DMN. **A)** Fosfatase alcalina (FA). **B)** Alanina transaminase (ALT). **C)** Bilirrubina total (BT). **D)** Asparato transaminase (AST). O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (PBSA sem hepatectomia) ($P < 0,05$). Os valores estão em porcentagem em relação ao controle, cuja média, dos valores absolutos, foi considerada 100%. As barras indicam a média \pm EPM.

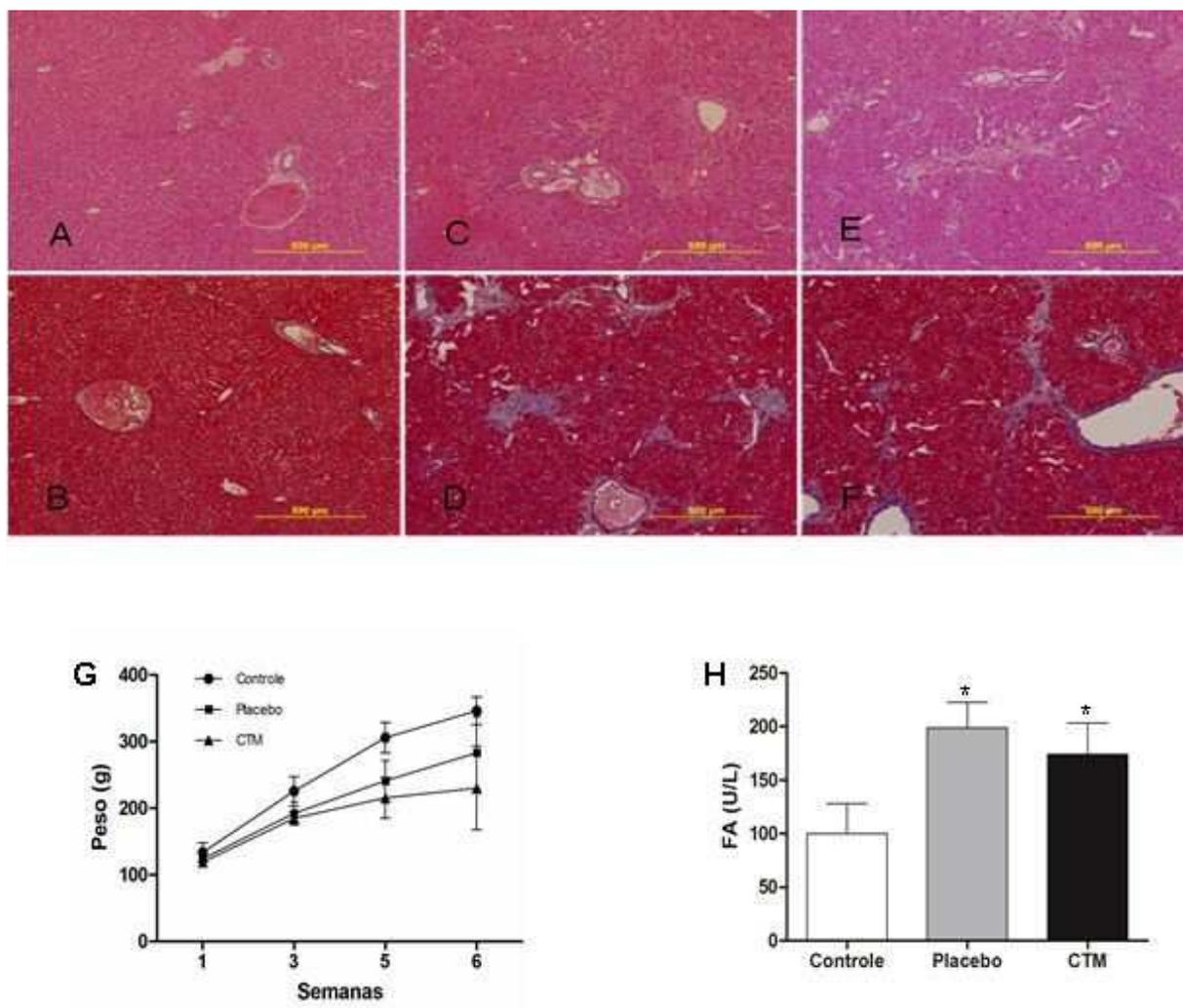


FIGURA 25: Análises do transplante com CTM de VCUH. Nas fotos das análises histológicas, a linha de cima são colorações por HE e a linha de baixo são colorações por tricromo de Masson. **A e B)** Grupo controle (G7), mostrando arquitetura hepática normal. **C e D)** Grupo G8 (placebo), mostrando alteração na arquitetura hepática e excesso de deposição de colágeno. **E e F)** Grupo G9 (tratado com CTM de VCUH), mostrando alteração na arquitetura hepática e deposição semelhantes ao do grupo placebo. **G)** Gráfico dos pesos dos ratos ao longo do tratamento com DMN e CTM de VCUH, mostrando que uma semana após o transplante de CTM de VCUH (na quinta semana) não houve ganho de peso do grupo G9 comparado ao grupo placebo. **H)** Gráfico dos níveis sorológicos da FA mostrando que os níveis de FA do G9 não diminuíram de modo significativo em relação ao grupo placebo. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Os valores estão em porcentagem em relação ao controle, cuja média foi considerada 100%. As barras indicam a média \pm EPM.

5 – CONCLUSÕES

- CTM utilizadas neste estudo apresentaram as características morfológicas, o padrão de marcadores de superfície e a capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica, esperados para CTM, como proposto pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Células-tronco.

- CTM de MOR são passíveis de diferenciação em hepatócitos, mostrando mudanças morfológicas e produção e estocagem glicogênio, quando submetidas a protocolos de um e dois passos, inclusive quando suplementados com soro de animais hepatectomizados.

- CTM humanas mostram mudanças morfológicas, capacidade de produção de glicogênio e síntese de albumina, apenas quando submetidas a protocolos de três passos que mimetizam os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do fígado.

- Uma etapa adicional prévia de definição endodérmica, seguida da diferenciação hepática, aumenta a capacidade das células diferenciadas de estocar glicogênio.

- O tratamento com DMN, em ratos Wistar, apresenta hepatotoxicidade dose-dependente e, na dose de 10 µg/g, aplicada 3 vezes por semana, durante 4 semanas, causa injúria hepática semelhante a estágios iniciais de fibrose hepática. Hepatectomia de 30% não agrava o dano causado pelo DMN.

- O transplante de CTM humanas (veia de cordão umbilical) não teve efeito em modelo pré-clínico de fibrose hepática em estágio inicial.

6 – BIBLIOGRAFIA

Ali, G., and Masoud, M.S. (2012). Bone marrow cells ameliorate liver fibrosis and express albumin after transplantation in CCl(4)-induced fibrotic liver. *Saudi J Gastroenterol* 18, 263-267.

Alison, M.R. (2002). Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 13, 385-387.

Ansil, P.N., Nitha, A., Prabha, S.P., Wills, P.J., Jazaira, V., and Latha, M.S. (2011). Protective effect of *Amorphophallus campanulatus* (Roxb.) Blume. tuber against thioacetamide induced oxidative stress in rats. *Asian Pac J Trop Med* 4, 870-877.

Aoki, T., Jin, Z., Nishino, N., Kato, H., Shimizu, Y., Niiya, T., Murai, N., Enami, Y., Mitamura, K., Koizumi, T., *et al.* (2005). Intrasplenic transplantation of encapsulated hepatocytes decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. *Transplantation* 79, 783-790.

Aurich, I., Mueller, L.P., Aurich, H., Luetzkendorf, J., Tisljar, K., Dollinger, M.M., Schormann, W., Walldorf, J., Hengstler, J.G., Fleig, W.E., *et al.* (2007). Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56, 405-415.

Awe, J.P., Lee, P.C., Ramathal, C., Vega-Crespo, A., Durruthy-Durruthy, J., Cooper, A., Karumbayaram, S., Lowry, W.E., Clark, A.T., Zack, J.A., *et al.* (2013). Generation and characterization of transgene-free human induced pluripotent stem cells and conversion to putative clinical-grade status. *Stem Cell Res Ther* 4, 87.

Ayatollahi, M., Soleimani, M., Tabei, S.Z., and Kabir Salmani, M. (2011). Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. *World J Stem Cells* 3, 113-121.

Banas, A., Yamamoto, Y., Teratani, T., and Ochiya, T. (2007). Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn* 236, 3228-3241.

Belanger, M., and Butterworth, R.F. (2005). Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis* 20, 409-423.

Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., and Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells* 22, 625-634.

Brenner, D.A. (2009). Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120, 361-368.

Bruzzo, P., and Strom, S.C. (2006). Historical aspects of hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 38, 1179-1180.

Bunnell, B.A., Betancourt, A.M., and Sullivan, D.E. (2010). New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 34.

Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.

Carvalho, A.B., Quintanilha, L.F., Dias, J.V., Paredes, B.D., Mannheimer, E.G., Carvalho, F.G., Asensi, K.D., Gutfilen, B., Fonseca, L.M., Resende, C.M., *et al.* (2008). Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem cells* 26, 1307-1314.

Chang, Y., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (2006). Toxic effects of gentamicin on marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Clin Orthop Relat Res* 452, 242-249.

Chen, M., Huang, J., Yang, X., Liu, B., Zhang, W., Huang, L., Deng, F., Ma, J., Bai, Y., Lu, R., *et al.* (2012). Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. *PLoS one* 7, e28203.

Chen, Y., Dong, X.J., Zhang, G.R., Shao, J.Z., and Xiang, L.X. (2007). In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem* 102, 52-63.

Chen, Y., Xiang, L.X., Shao, J.Z., Pan, R.L., Wang, Y.X., Dong, X.J., and Zhang, G.R. (2010). Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. *J Cell Mol Med* 14, 1494-1508.

Chivu, M., Dima, S.O., Stancu, C.I., Dobrea, C., Uscatescu, V., Necula, L.G., Bleotu, C., Tanase, C., Albulescu, R., Ardeleanu, C., *et al.* (2009). In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl Res* 154, 122-132.

Cho, K.A., Woo, S.Y., Seoh, J.Y., Han, H.S., and Ryu, K.H. (2012). Mesenchymal stem cells restore CCl₄-induced liver injury by an antioxidative process. *Cell Biol Int* 36, 1267-1274.

Choi, J.H., Hwang, Y.P., Choi, C.Y., Chung, Y.C., and Jeong, H.G. (2010). Anti-fibrotic effects of the anthocyanins isolated from the purple-fleshed sweet potato on hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine administration in rats. *Food Chem Toxicol* 48, 3137-3143.

Chowdhury, G., Calcutt, M.W., and Guengerich, F.P. (2010). Oxidation of N-Nitrosoalkylamines by human cytochrome P450 2A6: sequential oxidation to aldehydes and carboxylic acids and analysis of reaction steps. *J Biol Chem* 285, 8031-8044.

Christodoulou, I., Kolisis, F.N., Papaevangelidou, D., and Zoumpourlis, V. (2013). Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy. *Stem Cells Int* 2013, 246134.

Cohen, S., Samadikuchaksaraei, A., Polak, J.M., and Bishop, A.E. (2006). Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. *Tissue Eng* 12, 2025-2030.

Costa, R.H., Kalinichenko, V.V., Holterman, A.X., and Wang, X. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 38, 1331-1347.

Covas, D.T., Siufi, J.L., Silva, A.R., and Orellana, M.D. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 36, 1179-1183.

Dalgetty, D.M., Medine, C.N., Iredale, J.P., and Hay, D.C. (2009). Progress and future challenges in stem cell-derived liver technologies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297, G241-248.

Demetriou, A.A., Brown, R.S., Jr., Busuttil, R.W., Fair, J., McGuire, B.M., Rosenthal, P., Am Esch, J.S., 2nd, Lerut, J., Nyberg, S.L., Salizzoni, M., *et al.* (2004). Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 239, 660-667; discussion 667-670.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Dong, X.J., Zhang, H., Pan, R.L., Xiang, L.X., and Shao, J.Z. (2010). Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World journal of gastroenterology : WJG* 16, 3267-3278.

Dutra, C.B., Rath, S., and Reyes, F.G.R. (2007). Nitrosaminas voláteis em alimentos. *Alim Nutr Araraquara* 18, 111-120.

Farjam, M., Dehdab, P., Abbassnia, F., Mehrabani, D., Tanideh, N., Pakbaz, S., and Imanieh, M.H. (2012). Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: behavioral, biochemical and histological changes. *Iran Red Crescent Med J* 14, 164-170.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-53.

Fauzi, I., Panoskaltsis, N., and Mantalaris, A. (2012). Enhanced hematopoietic differentiation toward erythrocytes from murine embryonic stem cells with HepG2-conditioned medium. *Stem Cells Dev* 21, 3152-3161.

Fiegel, H.C., Lioznov, M.V., Cortes-Dericks, L., Lange, C., Kluth, D., Fehse, B., and Zander, A.R. (2003). Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem cells* 21, 98-104.

Forbes, S.J., and Parola, M. (2011). Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 207-217.

Fox, I.J., Chowdhury, J.R., Kaufman, S.S., Goertzen, T.C., Chowdhury, N.R., Warkentin, P.I., Dorko, K., Sauter, B.V., and Strom, S.C. (1998). Treatment of the

Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338, 1422-1426.

Fox, I.J., and Roy-Chowdhury, J. (2004). Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 40, 878-886.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3, 393-403.

Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 38 *Suppl* 1, S38-53.

Friedman, S.L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.

Galvao, F.H., de Andrade Junior, D.R., de Andrade, D.R., Martins, B.C., Marson, A.G., Bernard, C.V., Dos Santos, S.A., Bacchella, T., and Machado, M.C. (2006). Hepatocyte transplantation: State of the art. *Hepatol Res* 36, 237-247.

George, J., Rao, K.R., Stern, R., and Chandrakasan, G. (2001). Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology* 156, 129-138.

Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78, 783-809.

Grompe, M. (2006). Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inher Metab Dis* 29, 421-425.

Guo, L., Enzan, H., Hayashi, Y., Miyazaki, E., Jin, Y., Toi, M., Kuroda, N., and Hiroi, M. (2006). Increased iron deposition in rat liver fibrosis induced by a high-dose injection of dimethylnitrosamine. *Exp Mol Pathol* 81, 255-261.

Hagmann, S., Moradi, B., Frank, S., Dreher, T., Kammerer, P.W., Richter, W., and Gotterbarm, T. (2013). Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet Disord* 14, 223.

Hannan, N.R., Segeritz, C.P., Touboul, T., and Vallier, L. (2013). Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 8, 430-437.

Hata, J., Ikeda, E., Uno, H., and Asano, S. (2002). Expression of hepatocyte growth factor mRNA in rat liver cirrhosis induced by N-nitrosodimethylamine as evidenced by in situ RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 50, 1461-1468.

Hata, S., Namae, M., and Nishina, H. (2007). Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ* 49, 163-170.

Hay, D.C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z.A., McLean, D., Urruticochea-Uriguen, A., Black, J.R., Elcombe, C., Ross, J.A., Wolf, R., *et al.* (2008). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem cells* 26, 894-902.

He, Y., Zhou, J., Dou, K.F., and Chen, Y. (2003). A rat model for acute hepatic failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2, 423-425.

Herencia, C., Martinez-Moreno, J.M., Herrera, C., Corrales, F., Santiago-Mora, R., Espejo, I., Barco, M., Almaden, Y., de la Mata, M., Rodriguez-Ariza, A., *et al.* (2012). Nuclear translocation of beta-catenin during mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes is associated with a tumoral phenotype. *PloS one* 7, e34656.

Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 6, 425-456.

Hong, S.H., Gang, E.J., Jeong, J.A., Ahn, C., Hwang, S.H., Yang, I.H., Park, H.K., Han, H., and Kim, H. (2005). In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1153-1161.

Hu, Q.W., and Liu, G.T. (2006). Effects of bicyclol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in mice and its mechanism of action. *Life Sci* 79, 606-612.

Hyon, M.K., Kwon, E., Choi, H.J., and Kang, B.C. (2011). Dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and recovery in NOD/SCID mice. *J Vet Med Sci* 73, 739-745.

Iida, Y., Aoki, K., Asakura, T., Ueda, K., Yanaihara, N., Takakura, S., Yamada, K., Okamoto, A., Tanaka, T., and Ohkawa, K. (2012). Hypoxia promotes glycogen synthesis and accumulation in human ovarian clear cell carcinoma. *Int J Oncol* 40, 2122-2130.

Jezequel, A.M., Mancini, R., Rinaldesi, M.L., Ballardini, G., Fallani, M., Bianchi, F., and Orlandi, F. (1989). Dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. Evidence for an immunological mechanism. *J Hepatol* 8, 42-52.

Jezequel, A.M., Mancini, R., Rinaldesi, M.L., Macarri, G., Venturini, C., and Orlandi, F. (1987). A morphological study of the early stages of hepatic fibrosis induced by low doses of dimethylnitrosamine in the rat. *J Hepatol* 5, 174-181.

Ji, R., Zhang, N., You, N., Li, Q., Liu, W., Jiang, N., Liu, J., Zhang, H., Wang, D., Tao, K., *et al.* (2012). The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials* 33, 8995-9008.

Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904.

Jin, Y.L., Enzan, H., Kuroda, N., Hayashi, Y., Nakayama, H., Zhang, Y.H., Toi, M., Miyazaki, E., Hiroi, M., Guo, L.M., *et al.* (2003). Tissue remodeling following submassive hemorrhagic necrosis in rat livers induced by an intraperitoneal injection of dimethylnitrosamine. *Virchows Arch* 442, 39-47.

Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., and Yoo, J.U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272.

Jorns, C., Ellis, E.C., Nowak, G., Fischler, B., Nemeth, A., Strom, S.C., and Ericzon, B.G. (2012). Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. *J Intern Med* 272, 201-223.

Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., and Zaret, K.S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284, 1998-2003.

Jung, K.H., Shin, H.P., Lee, S., Lim, Y.J., Hwang, S.H., Han, H., Park, H.K., Chung, J.H., and Yim, S.V. (2009). Effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in a cirrhotic rat model. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29, 898-909.

Junqueira, L.C., and Carneiro, J. (2008). *Histologia básica*, 11 edn (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan).

Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., *et al.* (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18, 2127-2136.

Kang, J.S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Gonzalez, F.J., and Fukushima, S. (2007). Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* 67, 11141-11146.

Kang, X.Q., Zang, W.J., Bao, L.J., Li, D.L., Xu, X.L., and Yu, X.J. (2006). Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 30, 569-575.

Kang, X.Q., Zang, W.J., Song, T.S., Xu, X.L., Yu, X.J., Li, D.L., Meng, K.W., Wu, S.L., and Zhao, Z.Y. (2005). Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 3479-3484.

Kang, Y., Nagy, J.M., Polak, J.M., and Mantalaris, A. (2009). Proteomic characterization of the conditioned media produced by the visceral endoderm-like cell lines HepG2 and END2: toward a defined medium for the osteogenic/chondrogenic differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 18, 77-91.

Kassem, M. (2006). Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 436-442.

Kassem, M., Kristiansen, M., and Abdallah, B.M. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95, 209-214.

Langan, T.J., and Chou, R.C. (2011). Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods in molecular biology* 761, 75-83.

Lange, C., Bruns, H., Kluth, D., Zander, A.R., and Fiegel, H.C. (2006). Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 2394-2397.

Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, M.H., Kim, J.P., Lee, S.J., and Yoon, J. (2012). Possibility of undifferentiated human thigh adipose stem cells differentiating into functional hepatocytes. *Arch Plast Surg* 39, 593-599.

Lee, J.W., Kim, Y.H., Kim, S.H., Han, S.H., and Hahn, S.B. (2004a). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J* 45 Suppl, 41-47.

Lee, K.D., Kuo, T.K., Whang-Peng, J., Chung, Y.F., Lin, C.T., Chou, S.H., Chen, J.R., Chen, Y.P., and Lee, O.K. (2004b). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40, 1275-1284.

Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.M., Lee, K.D., Hsieh, S.L., and Chen, T.H. (2004c). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669-1675.

Lee, U.E., and Friedman, S.L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 195-206.

Li, J., Ning, G., and Duncan, S.A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* 14, 464-474.

Li, M., and Ikehara, S. (2013). Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int* 2013, 132642.

Lida, V.H., Silva, T.J.A., Silva, A.S.F., Silva, L.F.F., and Alves, V.A.F. (2005). Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias. *J Bras Patol Med Lab* 41, 29-36.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Lorenzini, S., Gitto, S., Grandini, E., Andreone, P., and Bernardi, M. (2008). Stem cells for end stage liver disease: how far have we got? *World journal of gastroenterology : WJG* 14, 4593-4599.

Lue, J., Lin, G., Ning, H., Xiong, A., Lin, C.S., and Glenn, J.S. (2010). Transdifferentiation of adipose-derived stem cells into hepatocytes: a new approach. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 30, 913-922.

Lysy, P.A., Smets, F., Sibille, C., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2007). Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 46, 1574-1585.

Mannheimer, E.G., Quintanilha, L.F., Carvalho, A.B., Paredes, B.D., Goncalves de Carvalho, F., Takyia, C.M., Resende, C.M., Ferreira da Motta Rezende, G., Campos de Carvalho, A.C., Schanaider, A., *et al.* (2011). Bone marrow cells obtained from cirrhotic rats do not improve function or reduce fibrosis in a chronic liver disease model. *Clin Transplant* 25, 54-60.

Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 507-520.

Mitry, R.R., Hughes, R.D., and Dhawan, A. (2002). Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol* 13, 463-467.

Moore, M.C., Coate, K.C., Winnick, J.J., An, Z., and Cherrington, A.D. (2012). Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr* 3, 286-294.

Moylan, C.A., Brady, C.W., Johnson, J.L., Smith, A.D., Tuttle-Newhall, J.E., and Muir, A.J. (2008). Disparities in liver transplantation before and after introduction of the MELD score. *JAMA* 300, 2371-2378.

Muraglia, A., Corsi, A., Riminucci, M., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Bianco, P., and Quarto, R. (2003). Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J Cell Sci* 116, 2949-2955.

Nakamura, T., and Nishina, H. (2009). Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish. *Hepatology* 49, 633-644.

Nasir, G.A., Mohsin, S., Khan, M., Shams, S., Ali, G., Khan, S.N., and Riazuddin, S. (2013). Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. *J Transl Med* 11, 78.

Navarro-Alvarez, N., Soto-Gutierrez, A., and Kobayashi, N. (2010). Hepatic stem cells and liver development. *Methods in molecular biology* 640, 181-236.

Ong, S.Y., Dai, H., and Leong, K.W. (2006). Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 12, 3477-3485.

Ong, W.K., and Sugii, S. (2013). Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 1083-1086.

Ozawa, S., Uchiyama, K., Nakamori, M., Ueda, K., Iwahashi, M., Ueno, H., Muragaki, Y., Ooshima, A., and Yamaue, H. (2006). Combination gene therapy of HGF and truncated type II TGF-beta receptor for rat liver cirrhosis after partial hepatectomy. *Surgery* 139, 563-573.

Passos, C.C., Ferreira, A.O., Blasquez, F.J.H., and Guerra, R.R. (2011). Modelos experimentais para indução da cirrose hepática em animais: revisão de literatura. *Biotemas* 23(2): 183-190.

Penteado, F.C.L., Orellana, M.D., Fontes, A.M., Kashima, S., and Covas, D.T. (2007). Diferenciação hepatocítica de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl* 28, 325-334.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.

Pinzani, M., Rosselli, M., and Zuckermann, M. (2011). Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 281-290.

Popp, F.C., Slowik, P., Eggenhofer, E., Renner, P., Lang, S.A., Stoeltzing, O., Geissler, E.K., Piso, P., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. (2007). No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem cells* 25, 639-645.

Prasajak, P., and Leraanansaksiri, W. (2013). Developing a New Two-Step Protocol to Generate Functional Hepatocytes from Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Hypoxic Condition. *Stem Cells Int* 2013, 762196.

Prideaux, M., Loveridge, N., Pitsillides, A.A., and Farquharson, C. (2012). Extracellular matrix mineralization promotes E11/gp38 glycoprotein expression and drives osteocytic differentiation. *PloS one* 7, e36786.

Puppi, J., Strom, S.C., Hughes, R.D., Bansal, S., Castell, J.V., Dagher, I., Ellis, E.C., Nowak, G., Ericzon, B.G., Fox, I.J., *et al.* (2012). Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 21, 1-10.

Quante, M., Benckert, C., Thelen, A., and Jonas, S. (2012). Experience Since MELD Implementation: How Does the New System Deliver? *Int J Hepatol* 2012, 264015.

Quintanilha, L.F., Mannheimer, E.G., Carvalho, A.B., Paredes, B.D., Dias, J.V., Almeida, A.S., Gutfilen, B., Barbosa da Fonseca, L.M., Resende, C.M., Rezende, G.F., *et al.* (2008). Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell Transplant* 17, 943-953.

Rahman, T.M., and Hodgson, H.J. (2000). Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 81, 145-157.

Ramachandran, P., and Iredale, J.P. (2012). Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution. *QJM* 105, 813-817.

Ranganathan, K., and Lakshminarayanan, V. (2012). Stem cells of the dental pulp. *Indian J Dent Res* 23, 558.

Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem cells* 19, 477-482.

Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.

Rosignoli, F., Caselli, A., Grisendi, G., Piccinno, S., Burns, J.S., Murgia, A., Veronesi, E., Loschi, P., Masini, C., Conte, P., *et al.* (2013). Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int* 2013, 901821.

Russo, F.P., and Parola, M. (2012). Stem cells in liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26, 35-45.

Saha, J.K., Xia, J., Sandusky, G.E., Chen, Y.F., Gerlitz, B., Grinnell, B., and Jakubowski, J.A. (2007). Study of plasma protein C and inflammatory pathways: biomarkers for dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 575, 158-167.

Salem, H.K., and Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells* 28, 585-596.

Salvalaggio, P., Afonso, R.C., Pereira, L.A., and Ferraz-Neto, B.H. (2012). The MELD system and liver transplant waiting-list mortality in developing countries: lessons learned from Sao Paulo, Brazil. *Einstein (Sao Paulo)* 10, 278-285.

Sancho-Bru, P., Najimi, M., Caruso, M., Pauwelyn, K., Cantz, T., Forbes, S., Roskams, T., Ott, M., Gehling, U., Sokal, E., *et al.* (2009). Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut* 58, 594-603.

Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M.M., and Davies, J.E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells* 23, 220-229.

Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., *et al.* (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987.

Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109, 1291-1302.

Seeberger, K.L., Eshpeter, A., and Korbitt, G.S. (2011). Isolation and culture of human multipotent stromal cells from the pancreas. *Methods in molecular biology* 698, 123-140.

Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 258-264.

Serls, A.E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J.M., and Deutsch, G.H. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 132, 35-47.

Shaker, M.E., Zalata, K.R., Mehal, W.Z., Shiha, G.E., and Ibrahim, T.M. (2011). Comparison of imatinib, nilotinib and silymarin in the treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative stress, injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 252, 165-175.

Sheil, A.G. (2002). Xenogeneic bioartificial liver support: where are we now? *Transplant Proc* 34, 2493-2495.

Shifley, E.T., Kenny, A.P., Rankin, S.A., and Zorn, A.M. (2012). Prolonged FGF signaling is necessary for lung and liver induction in *Xenopus*. *BMC Dev Biol* 12, 27.

Shin, M.O., Yoon, S., and Moon, J.O. (2010). The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Archives of pharmacal research* 33, 167-173.

Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297-305.

Sibov, T.T., Severino, P., Marti, L.C., Pavon, L.F., Oliveira, D.M., Tobo, P.R., Campos, A.H., Paes, A.T., Amaro, E., Jr., L, F.G., *et al.* (2012). Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology* 64, 511-521.

Simoes, I.N., Boura, J.S., dos Santos, F., Andrade, P.Z., Cardoso, C.M., Gimble, J.M., da Silva, C.L., and Cabral, J.M. (2013). Human mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: successful isolation and ex vivo expansion using serum-/xeno-free culture media. *Biotechnol J* 8, 448-458.

Snykers, S., De Kock, J., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2007). Differentiation of neonatal rat epithelial cells from biliary origin into immature hepatic cells by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicol In Vitro* 21, 1325-1331.

Starkel, P., and Leclercq, I.A. (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 319-333.

Subba Rao, M., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2013). Thinking outside the liver: Induced pluripotent stem cells for hepatic applications. *World journal of gastroenterology : WJG* 19, 3385-3396.

Sun, J., Yuan, Y., Qin, H., Ying, C., Liu, W., Zhang, J., He, Y., and Liu, Z. (2013). Serum from hepatectomized rats induces the differentiation of adipose tissue mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells and upregulates the expression of hepatocyte growth factor and interleukin-6 in vitro. *Int J Mol Med* 31, 667-675.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Talens-Visconti, R., Bonora, A., Jover, R., Mirabet, V., Carbonell, F., Castell, J.V., and Gomez-Lechon, M.J. (2006). Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 5834-5845.

Tannuri, A.C., Tannuri, U., Coelho, M.C., Santos, N.A., and Mello, E.S. (2007). Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats. *Clinics (Sao Paulo)* 62, 757-762.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836-847.

Tritto, G., Davies, N.A., and Jalan, R. (2012). Liver replacement therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 33, 70-79.

Tunon, M.J., Alvarez, M., Culebras, J.M., and Gonzalez-Gallego, J. (2009). An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World journal of gastroenterology : WJG* 15, 3086-3098.

Vater, C., Kasten, P., and Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7, 463-477.

Vellasamy, S., Sandrasaigaran, P., Vidyadaran, S., George, E., and Ramasamy, R. (2012). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue. *World J Stem Cells* 4, 53-61.

Viswanathan, P., and Gupta, S. (2012). New directions for cell-based therapies in acute liver failure. *J Hepatol* 57, 913-915.

Vosough, M., Omidinia, E., Kadivar, M., Shokrgozar, M.A., Pournasr, B., Aghdami, N., and Baharvand, H. (2013). Generation of Functional Hepatocyte-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells in a Scalable Suspension Culture. *Stem Cells Dev*.

Waclawczyk, S., Buchheiser, A., Flogel, U., Radke, T.F., and Kogler, G. (2010). In vitro differentiation of unrestricted somatic stem cells into functional hepatic-like cells displaying a hepatocyte-like glucose metabolism. *J Cell Physiol* 225, 545-554.

Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.

Wang, P.P., Wang, J.H., Yan, Z.P., Hu, M.Y., Lau, G.K., Fan, S.T., and Luk, J.M. (2004). Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 712-716.

Wang, T., Zhao, L.J., Li, P., Jiang, H., Lu, G.C., Zhang, W.D., Li, H.L., and Yuan, B.J. (2011). Hepatoprotective effects and mechanisms of dehydrocavidine in rats with carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *J Ethnopharmacol* 138, 76-84.

Watt, F.M., and Hogan, B.L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430.

Winnick, J.J., An, Z., Kraft, G., Ramnanan, C.J., Irimia, J.M., Smith, M., Lautz, M., Roach, P.J., and Cherrington, A.D. (2013). Liver glycogen loading dampens glycogen synthesis seen in response to either hyperinsulinemia or intraportal glucose infusion. *Diabetes* 62, 96-101.

Wu, X.B., and Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 11, 360-371.

- Yang, X.F., He, X., He, J., Zhang, L.H., Su, X.J., Dong, Z.Y., Xu, Y.J., Li, Y., and Li, Y.L. (2011). High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 18, 59.
- Ying, T.S., Sarma, D.S., and Farber, E. (1980). The sequential analysis of liver cell necrosis: inhibition of diethylnitrosamine- and dimethylnitrosamine-induced acute liver cell death by posttreatment with diethyldithiocarbamate. *Am J Pathol* 99, 159-174.
- Yu, H., Fang, D., Kumar, S.M., Li, L., Nguyen, T.K., Acs, G., Herlyn, M., and Xu, X. (2006). Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *Am J Pathol* 168, 1879-1888.
- Yu, J., Cao, H., Yang, J., Pan, Q., Ma, J., Li, J., Li, Y., Li, J., Wang, Y., and Li, L. (2012a). In vivo hepatic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood after transplantation into mice with liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 422, 539-545.
- Yu, Y., Fisher, J.E., Lillegard, J.B., Rodysill, B., Amiot, B., and Nyberg, S.L. (2012b). Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl* 18, 9-21.
- Yue, H.Y., Yin, C., Hou, J.L., Zeng, X., Chen, Y.X., Zhong, W., Hu, P.F., Deng, X., Tan, Y.X., Zhang, J.P., *et al.* (2010). Hepatocyte nuclear factor 4alpha attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut* 59, 236-246.
- Zaret, K.S. (2000). Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 92, 83-88.
- Zhang, Y.N., Lie, P.C., and Wei, X. (2009). Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 11, 548-558.
- Zhang, Z., Liu, J., Liu, Y., Li, Z., Gao, W.Q., and He, Z. (2013). Generation, characterization and potential therapeutic applications of mature and functional hepatocytes from stem cells. *J Cell Physiol* 228, 298-305.
- Zhao, D.C., Lei, J.X., Chen, R., Yu, W.H., Zhang, X.M., Li, S.N., and Xiang, P. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 3431-3440.
- Zhao, R., and Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41, 956-967.

SÚMULA CURRICULAR

1- DADOS PESSOAIS

Nome: Érica Moreira de Oliveira

Local e data de nascimento: Itaperuna/RJ, 12 de setembro de 1980.

2- EDUCAÇÃO

2.1- SEGUNDO GRAU

Colégio Estadual 10 de Maio, Itaperuna/RJ, 1998.

2.2- GRADUAÇÃO

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes/RJ, 2004. **Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado).**

2.2.1- INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Estudo da composição e utilização de lipídeos em ovos do carrapato *Boophilus microplus* durante a formação dos embriões. Realizado no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes/RJ. Março de 2002 a março de 2004. Orientador: professor Dr. Carlos Jorge de Oliveira Logullo. Bolsa Fundação Estadual do Norte Fluminense (FENORTE).

2.3- PÓS-GRADUAÇÃO

Mestrado em Ciências (Bioquímica)

Purificação e caracterização de uma carboxipeptidase e uma dipeptidase digestivas de larvas de *Tenebrio molitor*. Realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. Agosto de 2004 a agosto de 2008, sob orientação do professor Dr. Walter Ribeiro Terra. Bolsa CNPq.

2.3.1- Monitoria

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP, de agosto a dezembro de 2009. Disciplina Biologia Molecular, sob a supervisão da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar.

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), Departamento de Bioquímica, USP, de março a julho de 2010. Disciplina Bioquímica Metabólica, sob a supervisão do Prof. Dr. Pio Colepicolo.

2.4- ESTÁGIO

Diferenciação de hepatócitos a partir de células de cordão umbilical: modelo pré-clínico visando transplante-ponte em pacientes com hepatopatias. Realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP. Dezembro de 2006 a março de 2008, sob supervisão das professoras Dra Mari Cleide Sogayar e Dra. Anna Carla Goldberg. Bolsa Desenvolvimento Tecnológico Industrial – DTI categoria/nível 7H.

7.3- FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2010 - 2010** Isolamento e cultivo de células tronco (Carga horária: 60h) Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR, Curitiba/PR, Brasil.
- 2009 - 2009** Workshop hESC e hiPSC (Carga horária: 4h). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, IB-USP, São Paulo/SP, Brasil.
- 2008 - 2008** Curso básico: PCR em tempo real (Carga horária: 16h). LGC Biotecnologia, São Paulo/SP, Brasil.
- 2003 - 2003** Bioquímica do Câncer (Carga horária: 6h). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq, Caxambu/MG, Brasil.

7.4- OCUPAÇÃO

2012 - 2013 Bolsista de Apoio a pesquisa UNIEMP

2008 - 2012 Bolsista de Doutorado pelo CNPq

1° semestre de 2010 Bolsista PAE

2° semestre de 2009 Bolsista PAE

2006 - 2008 Bolsista DTI

2004 - 2006 Bolsista de Mestrado pelo CNPq

2002 - 2003 Bolsista de Iniciação Científica pela FENORTE

7.5- CURSOS MINISTRADOS

20-31 de Julho de 2009 IV Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

09-20 de Janeiro de 2006 1º Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular realizado no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

7.6- PUBLICAÇÕES

7.6.1- ARTIGOS COMPLETOS

Campos E, Moraes J, Façanha AR, Moreira E, Valle D, Abreu L, Manso PP, Nascimento A, Pelajo-Machado M, Lenzi H, Masuda A, Vaz Ida S Jr, Logullo C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*, v. 138, p. 349-357, 2006.

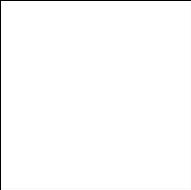
7.6.2- RESUMOS EM CONGRESSOS

1. Moreira E, Pazzini VB, Mantovani MC, Carvalho R, Sogayar MC, Goldberg AC. Hepatic failure animal model for cell based therapy. In: IV Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2011, Salvador - BA.

2. Moreira E, Pazzini VB, Piccinato CA, Sibov TT, Bucci DZ, Goldberg AC. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into "hepatocyte-like cells". In: V Congresso Brasileiro de Células-Tronco e Terapia Celular, 2010, Gramado - RS.

3. Moreira E, Kossugue P, Sogayar MC, Goldberg AC. Serum from hepatectomized rats may contribute to hepatocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. In: IV Simpósio Internacional Terapias Avançadas e Células-Tronco, 2009, Recife - PE.

4. Moreira E, Lopes AR, Terra WR. Partial purification and characterization of a carboxypeptidase and a dipeptidase from *Tenebrio molitor* larvae. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq, 2006, Águas de Lindóia - MG.



5. Moreira E, Masuda A, Logullo C, Vaz JR I, Moraes J. Lipid Composition and Utilization During *Boophilus microplus* Embryogenesis. In: XXXIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2004, Caxambu - MG.

6. Moreira E, Masuda A, Logullo C, Termignoni C, Vaz JR I, Moraes J. Lipid metabolism during *Boophilus microplus* embryogenesis. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu - MG.

7. Moreira E, Masuda A, Logullo C, Termignoni C, Vaz JR I, Moraes J. Metabolismo de lipídeo durante o desenvolvimento embrionário do carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: 8º Encontro de Iniciação Científica, realizado na UENF, 2003, Campos dos Goytacazes - RJ.