

Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas “Júlio de Mesquita Filho”



**“Indução da diferenciação hepatocítica a partir de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e da retina humanas”**

**Flora Cristina Lobo Penteado**

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Março - 2008

Universidade Estadual Paulista – UNESP  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas “Júlio de Mesquita Filho”

**“Indução da diferenciação hepatocítica a partir de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e da retina humanas”**

**Flora Cristina Lobo Penteado**

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Tese apresentada na seção de pós-graduação do departamento de Análises Clínicas para a obtenção do título de doutor

Março - 2008

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

P419i Penteadó, Flora Cristina Lobo  
Indução da diferenciação hepatocítica a partir de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e da retina humana. / Flora Cristina Lobo Penteadó. – Araraquara, 2008.  
108 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Dimas Tadeu Covas

1.Célula-tronco mesenquimal. 2.Diferenciação hepatocítica. 3.Albumina. 4.Citoqueratina 18. I.Covas, Dimas Tadeu, orient. II. Título.

**CDD: 616**

**CAPES: 40300005**

***Agradecimentos especiais***

- ✓ A Deus, pela Sua fidelidade demonstrada na minha vida.
  
- ✓ Ao meu futuro esposo Oduvaldo Lemasson Piantino Filho pelo apoio, amor, dedicação e paciência disponibilizados durante toda a minha caminhada rumo à conclusão desta tese.
  
- ✓ À minha mãe Flora Brasileira Carneiro Lobo, à minha avó Voleide Carneiro Lobo e à minha bisavó Marcília Mazieiro pelo incansável incentivo para a minha realização pessoal e profissional.
  
- ✓ Aos meus queridos sogros Dalva Manhas Piantino e Oduvaldo Lemasson Piantino pelo carinho e apoio em todos os momentos.

***Agradecimentos***

- ✓ Ao meu orientador, Dr. Dimas Tadeu Covas, pela orientação e oportunidade.
  
- ✓ Ao CTC-CEPID-FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.
  
- ✓ Às coordenadoras dos laboratórios de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto: Maristela Delgado Orellana, Aparecida Maria Fontes, Simone Kashima Haddad, Rita Carrara e Patrícia Viana Bonini Palma pela orientação e disponibilização dos laboratórios.
  
- ✓ Aos pesquisadores do Hemocentro de Ribeirão Preto: Virgínia Proença Picanço, Elisa Maria Russo Carbolante, Dalila Zanette e Rodrigo Panepucci pelo apoio.
  
- ✓ Aos biólogos dos laboratórios de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto: Karina Solano, Sâmia Caruso, Camila, Rochele Azevedo, Luis Alberto Andrade e Viviane Oliveira pela paciência e auxílio técnico.

- ✓ À Vani Corrêa, do laboratório de biologia celular e molecular e bioagentes patogênicos da FMRP-USP, pelo carinho e auxílio técnico.
  
- ✓ À profa. Dr. Maria Júlia Manso do IQ da USP-SP pela disponibilização do laboratório e do material radioativo.
  
- ✓ Aos meus queridos companheiros de trabalho que ainda não foram citados: Maria Fernanda Amarante, Aline, Elaine, Gislane Vilela, Tatiana Malta, Larissa, Evandra Strazza, Rodrigo Haddad, Jorge Siufi, Glauce Gaspar Gomes, Andrielle Fernandes, Fernanda Ursoli, Danilo de Almeida, Marcela Freitas, Daiane Cristina, Marta, Lucila Habib, Bruno Verbeno, Ana Valéria Andrade, Aline Garcia, Fernanda Trigo, Taísa, Kelen, Juliana Ueda, Alessandra de Paula, Carol Caliarí e Gaúcha, pelo apoio e contribuição para a realização deste projeto.
  
- ✓ À Cleide, Leandro e Ronaldo, do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo apoio com os camundongos.
  
- ✓ À Bernadete, Sandra, Luiz, Rodrigo e Cintia, funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela colaboração.

Agradeço imensamente a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão de mais esta importante etapa da minha vida.

## Lista de figuras

**Figura 1:** Representação esquemática do protocolo de diferenciação hepatocítica (modificado de Talens-Visconti e cols., 2006), página 26.

**Figura 2:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da medula óssea humana, página 35.

**Figura 3:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da retina humana, página 35.

**Figura 4:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação adipogênica. Coloração com Sudan II – Escarlata e Hematoxilina de Harris, página 37.

**Figura 5:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação osteogênica. Coloração com Von Kossa e Hematoxilina de Harris, página 37.

**Figura 6:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação condrogênica. Imunohistoquímica para Colágeno II, página 38.

**Figura 7:** Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea (MO14) e induzidas à diferenciação hepatocítica, página 39.

**Figura 8:** Microfotografia de CTM isoladas da retina (RET2) e induzidas à diferenciação hepatocítica., página 39.

**Figura 9:** Representação gráfica da dissociação do produto amplificado pelos oligonucleotídeos do gene CK18 na RT-PCR em tempo real, página 41.

**Figura 10:** Representação gráfica da curva de amplificação dos oligonucleotídeos do gene CK18 na RT-PCR em tempo real, página 41.

**Figura 11:** Perfil de expressão dos marcadores ALB, CK18 e CK19 nas células induzidas à diferenciação hepatocítica nos diferentes pontos: dia 2 (D2), dia 7 (D7), dia 14 (D14), dia 21 (D21) e dia 28 (D28), analisadas por RT-PCR em tempo real, página 42.

**Figura 12:** Perfil de expressão dos marcadores hepatocíticos nas 4 amostras de CTM isoladas da medula óssea, induzidas à diferenciação hepatocítica nos diferentes pontos: dia 2 (D2), dia 7 (D7), dia 14 (D14), dia 21 (D21) e dia 28 (D28), analisadas por RT-PCR em tempo real, página 43.

**Figura 13:** Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea (MO14) antes e após 21 dias de indução a diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, marcação com o anticorpo anti-albumina, página 45.

**Figura 14:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da retina (RET2) antes e após 21 dias de indução a diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, marcação com o anticorpo anti-albumina, página 46.

**Figura 15:** Microfotografia de CTM após a indução à diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, marcação com o anticorpo anti-citoqueratina 18, página 47.

**Figura 16:** Microfotografia de CTM após a indução à diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, marcação com o anticorpo anti-alfa-fetoproteína, página 48.

**Figura 17:** Perfil de expressão de albumina nas CTM isoladas de diferentes tecidos, analisadas por RT-PCR em tempo real, página 49.

**Figura 18:** Perfil eletroforético de proteínas totais em gel de poliacrilamida 12% (m/v) (SDS-PAGE), página 50.

**Figura 19:** Perfil eletroforético de proteínas totais marcadas com metionina radioativa na auto-radiografia, página 51.

**Figura 20:** Perfil eletroforético de proteínas totais. Sobreposição do gel de agarose 12% (m/v) e do filme da auto-radiografia, página 51.

**Figura 21:** Perfil eletroforético do produto da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina em gel de poliacrilamida 12% (m/v) (SDS-PAGE), página 52.

**Figura 22:** Auto-radiografia do perfil eletroforético da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina, página 52.

**Figura 23:** Perfil eletroforético do produto da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina. Sobreposição do gel de agarose 12% (m/v) e do filme da auto-radiografia, página 53.

**Figura 24:** Microfotografia de cortes histológicos do tecido hepático murino submetido ao dano pela administração de 0,5mg/Kg de CCl<sub>4</sub>, coloração HE, página 54.

**Figura 25:** Análise do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) página 57.



## **Lista de tabelas**

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização imunofenotípica das CTM humanas por citometria de fluxo, página 13.

**Tabela 2:** Anticorpos monoclonais utilizados na detecção dos marcadores hepatocíticos albumina, citoqueratina 18 e  $\alpha$ -fetoproteína por imunofluorescência, página 14.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos marcadores hepatocíticos citoqueratina 18 e citoqueratina 19 e do controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, empregados na técnica de RT-PCR em tempo real para ensaios SYBR Green, sintetizados pela Applied Biosystems (Foster City, USA), página 15.

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene masculino humano SRY no tecido hepático de camundongos empregados na Nested-PCR, sintetizados pela Biosynthesis, INC ([www.biosyn.com](http://www.biosyn.com)), página 15.

**Tabela 5:** Porcentagem das células isoladas dos tecidos adultos e fetais positivas para os respectivos marcadores de superfície celular, página 36.

**Tabela 6:** Expressão dos marcadores imunofenotípicos nas CTM isoladas da medula óssea (MO 24) antes e depois da diferenciação hepatocítica, em diferentes tempos, página 40.

**Tabela 7:** Apresentação da média dos níveis séricos de TGO e TGP analisados em diferentes tempos após a administração de 0,3 e 0,5mg/Kg de CCl<sub>4</sub>, página 54.

**Tabela 8:** Relação entre a quantidade de CCl<sub>4</sub> administrada e o período em que os animais receberam as CTM, página 55.

**Tabela 9:** Relação entre os grupos de camundongos e a infusão de CTM ou PBS 1X, página 56.

## Lista de abreviaturas

- ✓ 3' – região carboxi-terminal do ácido nucleico
- ✓ 5' – região amino-terminal do ácido nucleico
- ✓ AFP – alfa-fetoproteína
- ✓ ALB – albumina
- ✓ ANOVA – análise de variância
- ✓ C/EBP $\beta$  – CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (fator de transcrição)
- ✓ CAR – carótida
- ✓ CCl<sub>4</sub> – tetracloreto de carbono
- ✓ CD – *cluster of differentiation*. Denominação utilizada para os marcadores de superfície celular, por exemplo: CD34, marcador de superfície celular de células-tronco hematopoéticas
- ✓ cDNA – DNA complementar (DNA sintetizado a partir de um RNAm)
- ✓ CK18 – citoqueratina 18
- ✓ CK19 – citoqueratina 19
- ✓ CK8 – citoqueratina 8
- ✓ c-Kit – receptor celular com atividade tirosina-quinase
- ✓ CLDN-3 – claudina 3
- ✓ colbs. – colaboradores
- ✓ CTLA-4 – antígeno 4 do linfócito T citotóxico
- ✓ CTM – células-tronco mesenquimais
- ✓ D.O. – densidade óptica
- ✓ DEPC – dietilpirocarbonato
- ✓ DMSO – dimetilsulfoxido
- ✓ DNA – ácido desoxirribonucléico
- ✓ dNTP – conjunto dos quatro desoxinucleosídeos trifosfatos
- ✓ DPP4 – dipeptil peptidase 4
- ✓ EDTA – ácido-etileno-diamino-tetracético
- ✓ EGF – fator de crescimento de células epidermais
- ✓ EpCAM – molécula de adesão de células epiteliais
- ✓ FAH – fumaril acetato hidrolase
- ✓ FAS – fáscia
- ✓ FGF – fator de crescimento de fibroblasto
- ✓ FIG – fígado

- ✓ FISH – hibridização in situ com sondas fluorescentes
- ✓ FITC – isotiocianato de fluoresceína
- ✓ GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
- ✓ GFAP – proteína ácida glial fibrilar
- ✓ GON - gônada
- ✓ HGF – fator de crescimento de hepatócito
- ✓ HLA – antígeno leucocitário humano
- ✓ HNF4 $\alpha$  – fator nuclear de hepatócito 4 $\alpha$
- ✓ ITS – insulina, transferrina e ácido selenoso
- ✓ Kb – kilobase
- ✓ kDa – kilodalton
- ✓ KDR – receptor celular do fator de crescimento de células endoteliais
- ✓ MO – medula óssea
- ✓ NCAM – molécula de adesão de células neurais
- ✓ O.N. – *overnight*
- ✓ OSM – oncostatina M
- ✓ pb – pares de bases
- ✓ PBS – tampão fosfato tamponado com salina
- ✓ PCR – reação em cadeia da polimerase
- ✓ PE – molécula fluorescente ficoeritrina
- ✓ PEPCCK – fosfoenolpiruvato carboxiquinase (catalizador da neoglicogênese)
- ✓ qsp – quantidade suficiente para
- ✓ RET – retina
- ✓ RNA – ácido ribonucleico
- ✓ RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
- ✓ rpm – rotações por minuto
- ✓ RT-PCR – transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase
- ✓ SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando SDS como agente desnaturante
- ✓ SFB – soro fetal bovino
- ✓ SPF – *specific pathogen free*
- ✓ T.A. – temperatura ambiente
- ✓ TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformador  $\beta$
- ✓ TGO – transaminase oxalacética

- ✓ TGP – transaminase pirúvica
- ✓ TNFR2 – receptor do fator de necrose tumoral
- ✓ U.V. – ultra violeta
- ✓  $\alpha$ -SMA – alfa actina de músculo liso

## SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
1 – INTRODUÇÃO .....	1
2 – OBJETIVOS .....	8
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	9
3.1 – ESQUEMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA .....	9
3.2 – MATERIAL BIOLÓGICO.....	10
3.2.1 – Células-tronco mesenquimais (CTM) humanas .....	10
3.2.1.1 – CTM da medula óssea e da retina adultas .....	10
3.2.1.2 – CTM dos tecidos fetais .....	10
3.2.2 – Linhagem celular Hep G2 .....	10
3.2.3 – Células estreladas do fígado .....	10
3.2.4 – Camundongos .....	11
3.3 – REAGENTES .....	12
3.3.1 - Padrão de peso molecular .....	12
3.3.2 – Enzimas .....	12
3.3.3 - Reagentes Químicos .....	12
3.3.3.1 – Ácidos .....	12
3.3.3.2 – Álcoois .....	12
3.3.3.3 – Antibióticos .....	12
3.3.3.4 – Anticorpos .....	13
3.3.3.5 – Corantes .....	14
3.3.3.6 - Oligonucleotídeos sintéticos .....	14
3.3.3.7 - Precursores não radioativos .....	15
3.3.3.8 - Precursores radioativos .....	15
3.3.3.9 – Sais .....	15
3.3.3.10 – Fatores de crescimento celular .....	16
3.3.3.11 – Outros .....	16

3.3.3.12 – <i>Kits</i> .....	17
3.3.4 - Soluções e Tampões .....	17
3.4 – MEIOS DE CULTIVO CELULAR .....	18
3.5 – MEIOS PARA A DIFERENCIAÇÃO CELULAR .....	20
3.6 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOCÍTICA <i>IN VITRO</i> .....	20
3.6.1 – Isolamento das CTM da medula óssea humana .....	20
3.6.1.1 – Separação das células mononucleares .....	20
3.6.1.2 – Seleção das células aderentes .....	21
3.6.2 – Isolamento das CTM da retina humana e dos tecidos fetais .....	21
3.6.2.1 – Digestão do tecido .....	21
3.6.2.2 – Seleção das células aderentes .....	21
3.6.3 – Caracterização das CTM isoladas .....	22
3.6.3.1 – Caracterização morfológica .....	22
3.6.3.2 – Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo .....	22
3.6.3.3 – Ensaio de diferenciação celular .....	23
3.6.3.3.1 – Análise citoquímica da diferenciação em adipócitos: coloração com Sudan II – Escarlate .....	23
3.6.3.3.2 – Análise citoquímica da diferenciação em osteócitos: coloração com Von Kossa .....	24
3.6.3.3.3 – Análise imuno-histoquímica da diferenciação em condrócitos .....	24
3.6.4 – Aplicação do protocolo diferenciação hepatocítica .....	25
3.6.5 – Análise morfológica das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica .....	26
3.6.6 – Análise imunofenotípica das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica por citometria de fluxo .....	26
3.6.7 – Análise molecular das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica por RT-PCR em tempo real .....	26
3.6.7.1 – Extração do RNA total das amostras por meio da metodologia do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol) .....	26
3.6.7.2 – Reação de transcrição reversa .....	27
3.6.7.3 – Reação da polimerase em cadeia em tempo real .....	27
3.6.8 – Análise das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica pela técnica de imunofluorescência .....	29

3.6.9 – Análise das CTM da medula óssea não induzidas à diferenciação hepatocítica para a produção de albumina .....	29
3.6.9.1 – Marcação das células em cultivo com metionina [ S35] .....	29
3.6.9.2 – Imunoprecipitação com o anticorpo anti-albumina .....	30
3.6.9.3 – Gel de poliacrilamida – SDS-PAGE .....	30
3.6.9.4 – Revelação da marcação radioativa .....	31
3.7 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE CTM PARA O TECIDO HEPÁTICO <i>IN VIVO</i> .....	31
3.7.1 – Indução do dano hepático por meio da administração de CCl <sub>4</sub> .....	31
3.7.2 – Infusão de CTM em camundongos da linhagem NOD-SCID portadores de dano hepático induzido .....	31
3.7.3 – Análise dos camundongos .....	32
3.7.3.1 – Análise histológica do fígado .....	32
3.7.3.2 – Determinação quantitativa da atividade das transaminases hepáticas no soro pelo método colorimétrico .....	32
3.7.3.3 – Análise do tecido hepático para a presença de células humanas .....	32
3.7.3.3.1 – Extração do DNA genômico .....	33
3.7.3.3.2 – Nested-PCR para o gene SRY humano .....	33
4 – RESULTADOS .....	34
4.1 – CARACTERIZAÇÃO DAS CTM ISOLADAS .....	34
4.1.1 – Caracterização morfológica por microscopia de luz .....	34
4.1.2 – Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo .....	36
4.1.3 – Ensaio de diferenciação celular .....	36
4.2 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOCÍTICA A PARTIR DAS CTM ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA E DA RETINA HUMANAS .....	38
4.2.1 – Análise morfológica por microscopia de luz .....	38
4.2.2 – Análise imunofenotípica por citometria de fluxo .....	40
4.2.3 – Análise molecular por RT-PCR em tempo real .....	40
4.2.3.1 – Curva de eficiência dos oligonucleotídeos desenhados para a metodologia de SYBR .....	40
4.2.3.2 – Análise da expressão dos marcadores hepatocíticos .....	41
4.2.4 – Análise da produção de marcadores hepatocíticos por imunofluorescência .....	43
4.3 – ANÁLISE DAS CTM PARA A PRODUÇÃO E SECREÇÃO DE	

ALBUMINA.....	49
4.3.1 – Análise da produção de albumina por RT-PCR em tempo real .....	49
4.3.2 – Análise da secreção de albumina por eletroforese em SDS-PAGE .....	50
4.4 – ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE CTM ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA PARA O TECIDO HEPÁTICO DANIFICADO DE CAMUNDONGOS NOD-SCID .....	53
4.4.1 – Experimento 1 – Estabelecimento do dano hepático induzido pela administração CCl <sub>4</sub> em camundongos da linhagem Balb/C .....	53
4.4.2 – Experimento 2 – Infusão de CTM em camundongos imunodeficientes induzidos ao dano hepático .....	54
4.4.2.1 – Análise da presença de CTM masculinas no tecido hepático dos camundongos fêmeas por Nested-PCR .....	55
4.4.3 – Experimento 3 – Infusão de CTM em camundongos imunodeficientes induzidos ao dano hepático pelo tratamento com CCl <sub>4</sub> durante 4 semanas .....	56
4.4.3.1 – Análise da presença de CTM masculinas no tecido hepático dos camundongos fêmeas por Nested-PCR .....	56
5 – DISCUSSÃO .....	58
6 – CONCLUSÕES .....	63
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
8 – ARTIGO CIENTÍFICO .....	75
9 – ANEXOS .....	101



## 1 - INTRODUÇÃO

### **Células-tronco em órgãos e tecidos adultos**

Durante a embriogênese, após a formação do zigoto totipotente, ocorre a progressão de uma série de eventos pré-programados pelo genoma (proliferação, diferenciação e progressão celular e regulação da apoptose) que resultará na formação de diferentes células, órgãos e tecidos. As células de cada uma das 3 camadas germinativas primárias, após seguidos processos de proliferação e segregação em linhagens comprometidas, formarão células-tronco multipotentes e unipotentes que finalmente darão origem aos diferentes tipos de células, órgãos e tecidos. Algumas células porém não seguem a progressão desses eventos e permanecem como células precursoras de reserva, fazendo a manutenção contínua e o reparo dos tecidos e órgãos durante toda a vida do indivíduo (CONLEY e cols., 2004). A essas células damos o nome de células-tronco somáticas, ou células-tronco do adulto. Estima-se que cada órgão tenha o seu próprio contingente de células de reserva, presentes em baixa quantidade, para o reparo do tecido. As células-tronco do adulto são caracterizadas por sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em pelo menos um tipo de célula madura. Essas células apresentam um nível maior de comprometimento tecido-específico do que as células-tronco embrionárias pois podem dar origem a todos os tipos celulares encontrados no seu órgão de origem mas, teoricamente, não às células de outros órgãos. Por esta razão são consideradas células multipotentes.

#### ✓ *Células-tronco do fígado*

O fígado possui uma grande capacidade de regeneração por meio da proliferação de células parenquimais adultas em resposta ao dano tecidual. Todavia, nos últimos anos surgiram evidências da existência de uma população de células-tronco intra-hepáticas que foram denominadas células ovais devido a sua morfologia; são células pequenas, com uma alta proporção núcleo:citoplasma. As células ovais são encontradas nos ramos terminais da árvore biliar, mais precisamente nos canais de *Hering* (FAUSTO e cols., 1993) e constituem uma população heterogênea de células em diferentes estágios de diferenciação e maturação. São consideradas células-tronco bipotentes pois apresentam potencial de diferenciação em hepatócitos e colangiócitos (ALISON e cols., 2004). Essas células representam um compartimento de reserva que só é ativado na presença de um dano severo, com o comprometimento da proliferação dos hepatócitos (BROOLING e cols., 2005).

O processo patológico que mais comumente envolve a participação das células ovais é a hepatite crônica severa, especialmente nas fases de necrose aguda, no qual são achadas nas

áreas de regeneração, fibrose e cirrose (MATSUSAK e cols., 2000; XIAO e cols., 2003; FOTIADU e cols., 2004). Não são células facilmente reconhecidas e possuem algumas características morfológicas e funcionais comuns aos hepatoblastos encontrados nos períodos embrionário e fetal (GROMPE, 2003; GUETTIER, 2005). A proporção de células ovais, hepatoblastos e hepatócitos no tecido hepático está diretamente relacionada com o estágio de desenvolvimento do fígado. No tecido fetal e neonatal são poucos os hepatócitos encontrados, os hepatoblastos são as células dominantes. Já no fígado adulto são encontrados poucos hepatoblastos (< 0,1%), as células ovais são as células progenitoras dominantes (0,3 a 0,7%) e a maioria das células parenquimais são hepatócitos diplóides e poliplóides e células epiteliais biliares (>97%). O perfil de expressão gênica desses três tipos celulares foi estudado em humanos. As células ovais mostraram a expressão de EpCAM, NCAM, CK19, c-Kit, CLDN-3 e baixos níveis de albumina. Os hepatócitos expressaram os marcadores típicos de células maduras do fígado como albumina, transferrina, conexinas, PEPCK, DPP4 e P450s. Os hepatoblastos apresentaram-se como células intermediárias, mostrando a expressão dos mesmos marcadores encontrados nas células ovais e baixos níveis dos marcadores encontrados nos hepatócitos, porém, com positividade para AFP (SCHMELZER e cols., 2006). Apesar do perfil imunofenotípico das células ovais ainda não ter sido bem caracterizado, a expressão dos marcadores de superfície OV-6 e H-4 e de alguns marcadores associados com células hematopoéticas como Thy, Sca e CD34 (PETERSEN e cols., 1998, 2003), também já foi associada a elas.

O estudo das células ovais vem sendo amplamente realizado em modelos murinos de hepatectomia parcial associada à administração de 2-acetilaminofluoreno (EVARTS e cols., 1989; ANILKUMAR e cols., 1995; GOLDING e cols., 1995). O modelo estabelecido permite que as células ovais se desloquem das zonas portal e periportal para o parênquima hepático via veia central e entrem no estágio final da diferenciação.

#### ✓ *Células-tronco da medula óssea*

As primeiras células-tronco a serem descritas foram as hematopoéticas, em um experimento clássico onde os pesquisadores transfundiram células da medula óssea de camundongos saudáveis em camundongos que tiveram a medula óssea previamente depletada por irradiação. Como resultado, a medula óssea e o sistema hematopoético dos camundongos irradiados foram reestabelecidos pelas células dos camundongos saudáveis (TILL e MCCULLOCH, 1961). Hoje sabemos que a medula óssea, por apresentar diversos tipos celulares distintos em sua composição, comporta pelo menos três diferentes tipos de células precursoras: as células-tronco hematopoéticas, as células-tronco mesenquimais e as células progenitoras endoteliais.

### ✓ *Células-tronco mesenquimais*

As células-tronco mesenquimais foram inicialmente descritas em 1966, quando foram isoladas a partir da medula óssea de ratos (FRIEDENSTEIN e cols., 1966). Outros órgãos e tecidos foram recentemente descritos como fontes de células-tronco mesenquimais. Entre eles estão sangue periférico (ZVAIFLER e cols., 2000), sangue de cordão umbilical (ERICES e cols., 2000), tecido adiposo (GRONTHOS e cols., 2001), líquido sinovial (DE BARI e cols., 2001), músculo esquelético (JANKOWSKI e cols., 2002), pulmão (NOORT e cols., 2002), dentes definitivos (MIURA e cols., 2003), veia umbilical (COVAS e cols., 2003) e veia safena (COVAS e cols., 2005), placenta (IGURA e cols., 2004), entre outros.

As células-tronco mesenquimais produzem importantes citocinas e fatores de crescimento que promovem a expansão e a diferenciação das células-tronco hematopoéticas em células sanguíneas na medula óssea. Além da manutenção e do reparo tecidual essas células possuem efeitos anti-proliferativo, imuno-modulatório e anti-inflamatório, o que têm despertado o interesse na sua utilização como agentes terapêuticos potenciais em distúrbios do sistema-imune (FANG e cols., 2006).

As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de aderência ao plástico, o que possibilita o seu isolamento *in vitro* após consecutivas passagens. Essas células não apresentam um antígeno de superfície específico portanto são usualmente caracterizadas pela combinação de características fenotípicas e funcionais. A caracterização fenotípica é realizada pela marcação com anticorpos monoclonais que reconhecem alguns dos antígenos de superfície encontrados nas células-tronco mesenquimais. Stro-1 (SIMMONS e TOROK-STORB, 1991), CD166 (BRUDER e cols., 1998), CD105 (BARRY e cols., 1999), CD73 (BARRY e cols., 2001) e mais recentemente o CD271 e o CD140b (BÜHRING e cols., 2007) são os antígenos mais utilizados no isolamento e purificação dessas células. As células-tronco mesenquimais apresentam negatividade para os marcadores de células hematopoéticas e de células endoteliais. A caracterização funcional é realizada por meio de ensaios de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Tais ensaios são baseados na capacidade das células-tronco mesenquimais de se diferenciarem linhagens celulares de osso, cartilagem, tendão e tecido adiposo, sob indução apropriada.

### **Células-tronco da medula óssea e seu papel no reparo do tecido hepático**

O primeiro trabalho sugerindo o papel de células-tronco extra-hepáticas no reparo do fígado foi publicado em 1999 (PETERSEN e cols., 1999). Os autores utilizaram ratos tratados com 2-acetilaminofluoreno para bloquear a proliferação dos hepatócitos e induzir a

proliferação de células ovais. As fêmeas murinas previamente irradiadas receberam células da medula óssea de machos não tratados. Quando analisados, os fígados dos animais transplantados apresentaram células marcadas positivamente para o cromossomo Y, sugerindo existência de uma população de células-tronco na medula óssea capaz de se diferenciar em células de fígado. Em 2000, dois artigos do mesmo grupo foram publicados com resultados semelhantes em camundongos e em humanos. Utilizando o transplante de medula óssea singênico entre animais de sexo opostos e a técnica de FISH em combinação com a marcação imuno-histoquímica para albumina, os autores mostraram que células do doador encontravam-se no fígado do receptor e que essas expressavam albumina (THEISE e cols., 2000). Da mesma forma, em humanos, os autores encontraram células do doador no fígado do receptor, e essas expressavam citoqueratina 8, 18 e 19 (THEISE e cols., 2000). Para tentar explicar a diferenciação das células-tronco adultas em células de tecidos não próprios foi postulada a teoria da transdiferenciação. Nesta, as células-tronco adultas sofreriam uma reprogramação gênica por influência do microambiente.

Estudos posteriores indicaram que as células que esses autores chamaram de hepatócitos derivados da medula óssea, encontradas no fígado dos receptores do transplante, eram na verdade produto de fusão entre as células do doador e do receptor. Após o transplante de medula óssea realizado entre camundongos de sexo opostos foi realizada a análise citogenética dos “hepatócitos derivados da medula óssea” e essas células apresentaram 80 cariótipos XXXY (fusão entre duas células diplóides) e 120 cariótipos XXXXXY (fusão entre uma célula diplóide e uma tetraplóide). Segundo os autores, as poucas células diplóides encontradas (40 cariótipos XX) podem ser uma contaminação da amostra com células hematopoéticas do doador ou ainda o produto da divisão reduzida dos hepatócitos que se fusionaram (WANG e cols., 2003). Em outro trabalho realizado no mesmo ano, camundongos com deficiência no gene da fumarilacetoacetato-hidrolase (Fah<sup>-/-</sup>) receberam o transplante de medula óssea de camundongos selvagens (Fah<sup>+/+</sup>). Os nódulos encontrados nos fígados dos receptores, quando analisados, apresentaram células que expressavam tanto os genes do doador quanto os do receptor, indicando fusão celular (VASSIPOULOS e cols., 2003). Os autores também afirmam que o marcador hematopoético CD45 foi silenciado após a fusão das células da medula óssea com os hepatócitos, o que indica que as células-tronco que participam da recuperação hepática são as mesenquimais, e que os RNAm da FAH não foram formados na medula óssea e sim ativados depois da fusão. Essa última afirmação nos dá indícios de que pode ocorrer uma reprogramação genética após a fusão, porém, não se

pode afirmar categoricamente que os hepatócitos podem reprogramar geneticamente as células da medula óssea e vice-versa.

A fusão das células da medula óssea com os hepatócitos foi atribuída à extrema pressão seletiva encontrada no fígado dos camundongos Fah<sup>-/-</sup>. Apesar dessa hipótese ser bastante razoável foi demonstrado que a fusão também ocorre em fígados normais (Alvarez-DOLADO e cols., 2003). Todavia, seis meses após essa publicação, um trabalho utilizando a mesma estratégia foi realizado e demonstrou que o transplante em camundongos irradiados leva a formação de células epiteliais derivadas da medula óssea no fígado dos receptores sem a evidência de fusão (HARRIS e cols., 2004).

Recentemente, Russo e colaboradores (2007) examinaram a contribuição quantitativa, funcional e temporal das células presentes na medula óssea para o tratamento da doença crônica do fígado. Camundongos fêmeas foram submetidos à irradiação letal e ao transplante de medula óssea total de camundongos machos, com injeções posteriores de frações celulares de células-tronco mesenquimais ou de células-tronco hematopoéticas, isoladas separadamente. Após, os receptores foram submetidos aos protocolos de indução do dano hepático por tetracloreto de carbono ou por tioacetamida. Os pesquisadores confirmaram a reconstituição completa da hematopoese por meio da análise do cromossomo Y no baço dos receptores e também certificaram-se de que as células estreladas dos receptores não tinham sido depletadas pela irradiação. A identificação das células dos doadores no tecido hepático dos receptores foi realizada por meio da hibridização com a sonda Y na técnica de FISH. A marcação imunohistoquímica para a GFAP (proteína ácida glial fibrilar) ou desmina, para alfa-SMA (alfa actina de músculo liso) e para CK8/18 (citoqueratina 8/18), identificou as células estreladas, os miofibroblastos e os hepatócitos, respectivamente. Como resultados, antes e após o dano hepático o número total de células estreladas presentes no fígado foi constante. Porém, após o dano, a proporção de células estreladas derivadas da medula óssea aumentou de 14% para 68%. Em contraste, o número total de miofibroblastos presentes no fígado após o dano foi maior do que o número total encontrado antes da indução ao dano. A proporção de miofibroblastos derivados da medula óssea foi de 69% a partir da primeira semana do dano e permaneceu constante até a 12a. semana. Já os hepatócitos derivados da medula óssea não foram encontrados nos fígados não induzidos ao dano e foram encontrados na proporção de 0.6% nos fígados danificados. Esses resultados sugerem que a contribuição das células-tronco da medula óssea no reparo do tecido hepático não está relacionada com a diferenciação das mesmas em hepatócitos.

As células-tronco da medula óssea podem de fato restaurar o tecido hepático. Isso é evidenciado por trabalhos que mostram a sobrevivência dos camundongos Fah<sup>-/-</sup> após o transplante com células de doadores selvagens. Porém, os mecanismos através dos quais isso se torna possível ainda não foram totalmente esclarecidos. A questão da plasticidade das células-tronco adultas, ou da capacidade que essas células têm de restaurar tecidos e órgãos não próprios ainda não foi esclarecida. Algumas teorias foram postuladas para tentar explicar esse fenômeno e as mais discutidas são: a transdiferenciação (THEISE e cols., 2000; THEISE e cols., 2000, HARRIS e cols., 2004), a fusão (WANG e cols., 2003, VASSIPOULOS e cols., 2003; ALVAREZ-DOLADO e cols., 2003) e, mais recentemente, o efeito parácrino que as células-tronco mesenquimais exercem (PAREKKADAN e cols., 2007; PAREKKADAN e cols., 2007).

### **Diferenciação hepatocítica “in vitro”**

A facilidade de propagação das células-tronco e a possibilidade de diferenciação hepatocítica *in vitro* gerou um crescente interesse na utilização dessas células para o tratamento de doenças crônicas e agudas do fígado. A capacidade de auto-renovação as faz, em teoria, particularmente empregáveis como fonte ilimitada de material doador no transplante celular para a regeneração hepática (CZYZ e cols., 2003). Também já foi sugerido o uso de células-tronco, previamente diferenciadas em hepatócitos, na construção de fígados bioartificiais para o tratamento curativo da falência do órgão causada pela doença aguda (KOBAYASHI e cols., 2003). Para que essas aplicações clínicas possam realmente se tornar uma alternativa de tratamento é necessário que se estabeleça protocolos de diferenciação *in vitro* eficientes e bem definidos. Esses protocolos são baseados na adição de citocinas e fatores de crescimento ao meio mínimo de cultivo celular, isento de soro fetal bovino, para tentar mimetizar os estímulos ocorridos durante a embriogênese. Tais protocolos também representariam um modelo de estudo dos mecanismos moleculares e dos caminhos de sinalização que regulam a hepatogênese.

Várias citocinas e fatores de crescimento mostraram-se eficientes na diferenciação hepatocítica sob as condições de cultivo *in vitro*. Dentre eles o fator de crescimento de hepatócito (HGF), o fator de crescimento epidermal (EGF) (MICHALPOULOS e cols., 2003), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (LEE e cols., 2004) e a oncostatina M (OSM) (LÁZARO e cols., 2003) são utilizados na maioria dos estudos. Fatores químicos não protéicos como a dexametasona (MICHALPOULOS e cols., 2003), a nicotinamida (SATO e cols., 1999) e o ácido retinóico (ALISI e cols., 2003) também são comumente utilizados.

Estudos *in vitro* foram realizados para tentar esclarecer a questão da diferenciação das células-tronco mesenquimais em hepatócitos. Oh e colaboradores (2000) reportaram o aparecimento de proteínas do tecido hepático albumina e alfa-fetoproteína em células da medula óssea de ratos, quando cultivadas em condições apropriadas durante 21 dias. Em condições apropriadas de cultivo, não só as células-tronco mesenquimais da medula óssea, mas também as células-tronco mesenquimais isoladas a partir do cordão umbilical e as células-tronco hematopoéticas podem dar origem a hepatócitos (KAKINUMA e cols., 2003; FIEGEL e cols., 2003).

Até o momento, a questão da diferenciação das células-tronco mesenquimais em hepatócitos não foi bem esclarecida e estudos neste sentido, *in vivo* e *in vitro*, se fazem necessários. O presente trabalho propõe avaliar o comportamento das células-tronco mesenquimais humanas da medula óssea e da retina frente à indução da diferenciação hepatocítica *in vitro*, bem como analisar o potencial de migração das células isoladas da medula óssea para o tecido hepático danificado *in vivo*.

## 2 – OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade das células-tronco mesenquimais para se diferenciarem em células com características morfológicas e funcionais de hepatócitos *in vitro* e analisar o potencial de migração das mesmas para o tecido hepático danificado *in vivo*.

### Objetivos Específicos

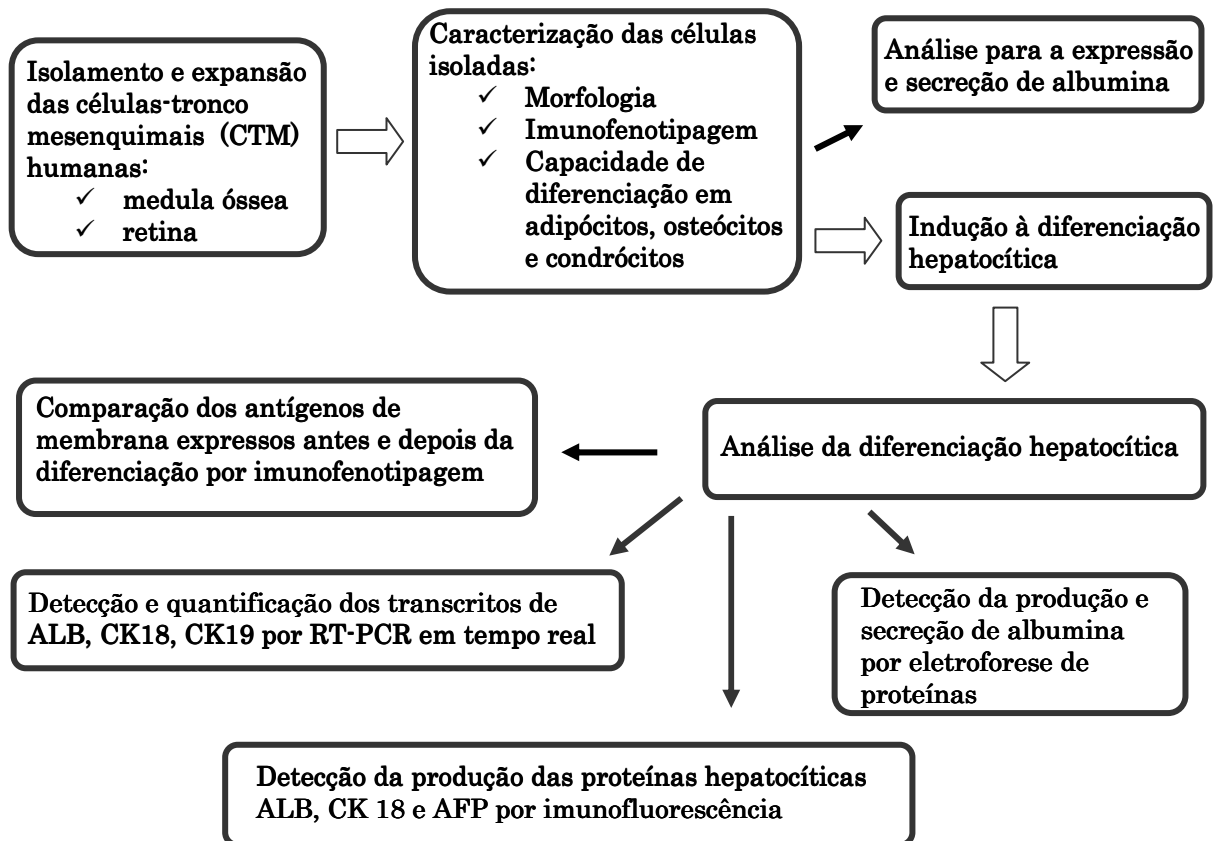
- ✓ Obtenção e caracterização das células-tronco mesenquimais isoladas a partir da medula óssea humana e da retina humanas.
- ✓ Indução das células isoladas a diferenciação hepatocítica *in vitro*.
- ✓ Análise morfológica das células induzidas a diferenciação hepatocítica.
- ✓ Análise molecular das células induzidas a diferenciação hepatocítica para a presença dos marcadores albumina, citoqueratina 18, citoqueratina 19 e  $\alpha$ -fetoproteína.
- ✓ Análise molecular de células-tronco mesenquimais isoladas de diferentes tecidos fetais e adultos para a expressão de albumina.
- ✓ Estabelecimento do protocolo e análise do dano hepático induzido por meio da administração de CCl<sub>4</sub> em camundongos da linhagem Balb/C.
- ✓ Aplicação do protocolo de dano hepático induzido e infusão de células-tronco mesenquimais humanas isoladas da medula óssea em camundongos da linhagem NOD-SCID, e posterior análise do tecido para a presença de células masculinas (positivas para o cromossomo Y).



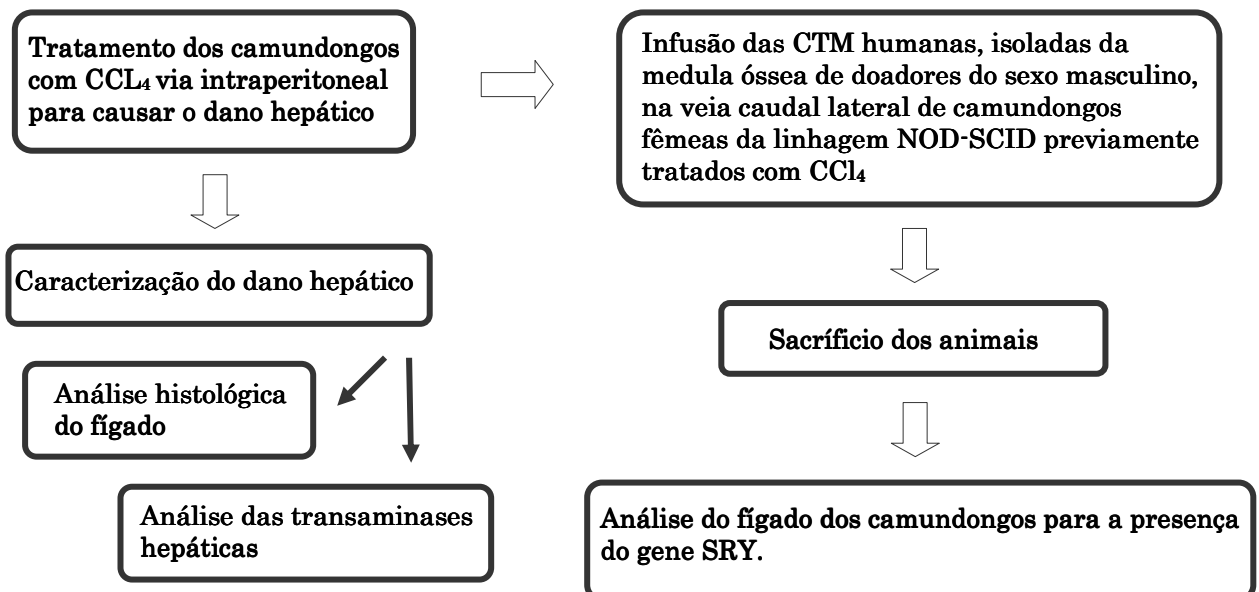
### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – ESQUEMA DA ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA

##### *In vitro*



##### *In vivo*



## **3.2 – MATERIAL BIOLÓGICO**

### **3.2.1 – Células-tronco mesenquimais (CTM) humanas**

O isolamento e a caracterização das CTM foi realizada no CTC-CEPID-FAPESP como parte integrante de outros projetos de pesquisa conduzidos pelo orientador.

#### **3.2.1.1 – CTM da medula óssea e da retina**

Foram previamente isoladas da crista ilíaca de doadores de medula óssea do Hemocentro e de doadores de córnea do Banco de Olhos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. A sua utilização foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, cujo número do processo é 1783/2004.

#### **3.2.1.2 – CTM dos tecidos fetais**

Os tecidos fetais utilizados foram fâscia, gônada, carótida e fígado. O procedimento de coleta foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, cujo número do processo é 4855/2004.

### **3.2.2 – Linhagem celular Hep G2**

As células da linhagem Hep G2 (ATCC no. HB8065) são células humanas estabelecidas a partir do carcinoma hepatocelular. Essa linhagem dispõe de características morfológicas e funcionais de hepatócitos normais, incluindo a síntese de proteínas plasmáticas e a expressão de transportadores orgânicos solúveis (KNOWLES e cols., 1980).

As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas neste trabalho como controle nas análises da diferenciação hepatocítica.

### **3.2.3 – cDNA de células extraídas do fígado humano**

Foi gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, do laboratório de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto. O cDNA foi utilizado na RT-PCR em tempo real como molde para a avaliação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos e como calibrador na análise comparativa da expressão de albumina nas CTM.

### 3.2.4 – Camundongos

Balb/C é uma linhagem de camundongos originada em 1.923 pelo pesquisador McDowell. Os camundongos são albinos, isogênicos e frequentemente utilizados para a produção de anticorpos monoclonais. A linhagem é amplamente utilizada nas diversas áreas da pesquisa científica. No presente trabalho foram utilizados 18 camundongos da linhagem Balb/C para a padronização do dano hepático ocasionado pela administração intra-peritoneal de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>).

NOD-*scid* é uma linhagem de camundongos diabéticos não obesos (NOD) que não apresentam imunidade humoral ou celular por serem homozigóticos para uma mutação do gene *scid*. A mutação se localiza no cromossomo 16 e resulta na perda de linfócitos T e B. Os linfócitos *natural killer* e as células mielóides apresentam desenvolvimento normal (LEBLOND e cols., 1997). A caracterização gênica do fenótipo NOD ainda não foi bem esclarecida. Dados da literatura sugerem que esse fenótipo é resultante de um complexo de mutações em diferentes regiões cromossômicas como, por exemplo, genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) no cromossomo 3, genes que codificam o CD28 e CTLA-4 no cromossomo 1, genes que codificam os antígenos CD30, TNFR2 e CD137 no cromossomo 4, entre outros (JOHANSSON e cols., 2003). Devido a essas características, estes animais constituem organismos modelos em estudos que envolvem a avaliação do potencial das células-tronco humanas na medicina regenerativa e na terapia celular. Neste trabalho foram utilizados 12 camundongos fêmeas, isogênicos, da linhagem NOD-*scid* (HESELTON e cols., 1995), com idade entre 6 a 8 semanas e peso entre 18 e 22g. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério – Livre de Patógenos Específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP e mantidos sob a supervisão da médica veterinária Cleide Lúcia Araújo Silva. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno com isolador, que continham maravalha de pinho autoclavada. Receberam ração comercial Nuvital<sup>®</sup> e água autoclavadas. A utilização dos animais neste projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, cujo número do protocolo é 06.1.364.53.0.

### 3.3 – REAGENTES

#### 3.3.1 - Padrão de peso molecular

- ✓  $\phi$ X-174RFI digerido com HaeIII (Pharmacia, Uppsala, Suécia)
- ✓ LMW-SDS *marker* (GE HealthCare, Buckinghamshire, UK)

#### 3.3.2 - Enzimas

- ✓ Colagenase Tipo I-A (Sigma, St Louis, USA)
- ✓ DNase I (Deoxiribonuclease) (QIAGEN, São Paulo, Brasil)
- ✓ *Multi Scribe Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ✓ Taq DNA polimerase (Pharmacia, Uppsala, Suécia)
- ✓ Tripsina-EDTA 10X (GIBCO, Grand Island, USA)

#### 3.3.3 - Reagentes Químicos

##### 3.3.3.1 - Ácidos

- ✓ Ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Ácido clorídrico (Merck, Darmstadt, Alemanha )

##### 3.3.3.2 - Álcoois

- ✓ Etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha)

##### 3.3.3.3 - Antibióticos

- ✓ Solução Penicilina/Estreptomicina 100X (GIBCO, Grand Island, USA)

### 3.3.3.4 – Anticorpos

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização imunofenotípica das CTM humanas por citometria de fluxo.

<b>Anticorpos</b>	<b>Molécula conjugada</b>	<b>Clone</b>	<b>Marca *</b>
<b>CD45</b>	FITC	2D1	BD Biosciences
<b>CD14</b>	PE	M5E2	BD Bioscience
<b>HLA-classel</b>	PE	G46-2.6	Pharmingen
<b>HLA-DR</b>	FITC	G46-6(L243)	Pharmingen
<b>CD34</b>	PE	563	BD Biosciences
<b>CD73</b>	PE	AD2	Pharmingen
<b>CD49e</b>	PE	IIA1	Pharmingen
<b>CD51/61</b>	FITC	23C6	Pharmingen
<b>CD44</b>	PE	515	Pharmingen
<b>CD29</b>	PE	HUTS-21	Pharmingen
<b>CD13</b>	PE	WM15	Pharmingen
<b>CD90</b>	PE	5E10	Pharmingen
<b>CD105</b>	puro	266	Pharmingen
<b>KDR</b>	puro	KDR-1	Sigma
<b>CD54</b>	PE	HA58	Pharmingen
<b>Isotipo controle (IgG<sub>2a</sub>/IgG<sub>1</sub>)</b>	FITC/PE	X39/X40	BD Biosciences
<b>Anti-IgG de camundongo</b>	FITC	policlonal	BD Biosciences
<b>Anti-IgM de camundongo</b>	FITC	policlonal	Caltag

\* Pharmingen (San Diego, USA), Sigma (St. Louis, USA), R&D Systems (Minneapolis, USA), Dako (Glostrup, Dinamarca) e Caltag (Burlingame, USA).

**Tabela 2:** Anticorpos monoclonais utilizados na detecção dos marcadores hepatocíticos albumina, citoqueratina 18 e  $\alpha$ -fetoproteína por imunofluorescência.

Anticorpo	Molécula conjugada	Clone	Marca *
ALB		policlonal	Dako
CK 18		DC10	Dako
AFP		policlonal	Dako
anti-IgG de coelho	FITC	policlonal	Dako
anti-IgG de camundongo	PE	policlonal	Calbiochem

\* Dako (Glostrup, Dinamarca) e Calbiochem (Darmstadt, Alemanha).

### 3.3.3.5 - Corantes

- ✓ Azul brilhante de Coomassie (BIO-RAD, Hercules, USA)
- ✓ Azul de bromofenol (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✓ Brometo de Etídio (Sigma, St. Louis, EUA)
- ✓ DAPI II (Vysis, Downers Grove, USA)
- ✓ Escarlata R (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✓ Solução de Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- ✓ Solução de Hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- ✓ Solução de Leishman (Dols reagentes, Goiânia, Brasil)
- ✓ Sudan II (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✓ Violeta de genciana (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil)

### 3.3.3.6 - Oligonucleotídeos sintéticos

- ✓ Reagentes pré-desenvolvidos para ensaios TaqMan: ALB (albumina) (Hs00609411\_m1) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) (PN: 4310884E) (Applied Biosystems, Foster City, USA)

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos marcadores hepatocíticos citoqueratina 18 e citoqueratina 19 e do controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, empregados na técnica de RT-PCR em tempo real para ensaios SYBR *Green*, sintetizados pela Applied Biosystems (Foster City, USA)

Gene	Sequência	Posição	Temperatura de melting (T.M.)
CK 18 (P5')	5'-TGGAAGATGGCGAGGACTTT-3'	1.266 – 1.285	58°C
CK18 (P3')	5'-AGACACCACTTTGCCATCCACTA-3'	1.353 – 1.375	60°C
CK 19 (P5')	5'-GAGCAGGTCCGAGGTTACTGA-3'	1.008 – 1.028	58°C
CK19 (P3')	5'-CCGTTTCTGCCAGTGTGTCTT-3'	1.097 – 1.117	59°C
GAPDH (P5')	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'	539 – 551	62°C
GAPDH (P3')	5'-CATGGACTGTGGTCATGAGTCCT-3'	618 – 640	60°C

**Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados para a detecção do gene masculino humano SRY no tecido hepático de camundongos empregados na *Nested*-PCR, sintetizados pela Bio-Synthesis, INC (www.biosyn.com)

Nome	Sequência	Posição	T.M.	Produto
P5FAESRY	P5'-GAATATTCCCGCTCTCCGGA-P3'	217 – 226	62°C	424 pb
P3FAMESRY	P5'-GTACAACCTGTTGTCCAGTTG-P3'	281 – 304	62°C	424 pb
P5FAISRY	P5'-CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT-P3'	522 – 545	70°C	265 pb
P3FAMISRY	P5'-GACGAGGTCGATACTTATAATTCG-P3'	620 – 630	68°C	265 pb

### 3.3.3.7 - Precursores não radioativos

- ✓ Deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (Pharmacia, Upsalla, Suécia)
- ✓ Glicina (Pharmacia, Uppsala, Suécia)
- ✓ L-glutamina (GIBCO, Grand Island, USA)

### 3.3.3.8 - Precursores radioativos

- ✓ Metionina [ $S^{35}$ ] (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

### 3.3.3.9 - Sais

- ✓ Acetato de sódio (Merck, Darmtadt, Alemanha)

- ✓ Ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Cloreto de magnésio (Pharmacia, Upsalla, Suécia)
- ✓ Cloreto de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Fosfato de potássio dihidrogenado (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Fosfato de sódio monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N`-[2-ethanesulfonic acid]) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Nitrato de prata (CENNABRAS, Guarulhos, Brasil)
- ✓ Tiosulfato de Sódio (MERCK, Gibbstown, USA)
- ✓ Tris-base (Sigma, St. Louis, USA)

#### **3.3.3.10 – Fatores de crescimento celular**

- ✓ Ácido ascórbico - (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Dexametasona (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Fator de crescimento de epiderme 100X (EGF) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Fator de crescimento de fibroblastos (FGFb) (Prepotech, Colonia Napoles, México)
- ✓ Fator de crescimento de hepatócito (HGF) (Prepotech, Colonia Napoles, México)
- ✓ Fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Peprotech, Colonia Napoles, México)
- ✓ Insulina (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ ITS premix 100X (insulina, transferrina e ácido selenoso) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Nicotinamida (farmácia de manipulação de fórmulas, Ribeirão Preto, Brasil)
- ✓ Oncostatina M (OSM) (Sigma, St. Louis, USA)

#### **3.3.3.11 - Outros**

- ✓ Agarose (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Albumina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✓ Albumina Humana 20% (Aventis-Behring Hoechst, São Paulo, Brasil)
- ✓ Clorofórmio (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✓ Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Éter (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)



- ✓ Fluoromont-G (EMS, Hatfield, USA)
- ✓ Formaldeído 20% (EMS, Hatfield, USA)
- ✓ Glicogênio (USB, Cleaveland, USA)
- ✓ Indometacina (Sigma, St. Louis, USA)
- ✓ Paraformaldeído 20% (EMS, Hatfield, USA)
- ✓ Permunt SP 15 (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)
- ✓ Piruvato de Sódio 100mM (GIBCO, Grand Island, USA)
- ✓ Sacarose (Merck, Rio de Janeiro, Brasil)
- ✓ Soro de cabra (Caltag, Burlingame, USA)
- ✓ Soro Fetal Bovino (HyClone) (GIBCO, Grand Island, USA)
- ✓ Tetracloreto de carbono (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol) (Invitrogen, Auckland, Nova Zelândia)
- ✓ Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, USA)
- ✓  $\beta$ -Glicerolfosfato (Goldlab, Ribeirão Preto, Brasil)
- ✓  $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, USA)

#### **3.3.3.12 - Kits**

- ✓ DNasy Tissue (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha)
- ✓ DryEase Mini-Gel Drying System (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ✓ High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ✓ SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ✓ TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- ✓ Transaminase oxalacética (TGO) (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil)
- ✓ Transaminase pirúvia (TGP) (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil)
- ✓ XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Carlsbad, USA)

#### **3.3.4 - Soluções e Tampões**

##### **Azul brilhante de Coomassie**

Metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v), azul brilhante de Coomassie 0,2% (m/v).

##### **Solução de bloqueio para imunofluorescência**

Albumina bovina 1% (v/v), soro de cabra 10% (v/v) em PBS 1X.

**Solução de Sudan II – Escarlata**

0,02g de Sudan II, 0,02g de Escarlata R em 10mL de álcool 70% (v/v). Essa solução deve ser mantida em banho-maria (37°C) durante 30 a 60min. até dissolver totalmente. Deve ser esterilizada por filtração e armazenada a temperatura ambiente (T.A.).

**Solução de Türk**

Violeta de genciana 0,01% (m/v) em ácido acético 3% (v/v). Essa solução deve ser filtrada em papel de filtro.

**Tampão de amostra para gel de poliacrilamida**

Tris-HCl 0,05M pH 6.8, SDS 1% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v), sacarose 5% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (v/v).

**Tampão de aplicação de amostras de DNA em gel de agarose**

Azul de bromofenol 0,25% (m/v) em glicerol 30% (v/v).

**Tampão fosfato tamponado com salina (PBS) 10X**

NaCl 8g, KCl 0,2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24g, água Milli-Q quantidade suficiente para (qsp) 1L. O pH deve ser ajustado para 7.4 e a solução autoclavada por 20min. a 121°C e 1 atmosfera de pressão.

**Tampão TAE 50X**

Tris-base 242 g, ácido acético glacial 57,1 mL, EDTA 50 mM. Acertar o pH em 8,0 e completar o volume para 1 L com água Milli-Q. Essa solução deve ser autoclavada por 20 minutos (min.), a 121 °C e 1 atmosfera de pressão.

**3.4 – MEIOS DE CULTIVO CELULAR** ***$\alpha$ -MEN (Minimum Essential Medium Alpha Medium)*** (GIBCO, Grand Island, USA)

O meio pré-sintetizado e liofilizado foi dissolvido em água Milli-Q. Foram adicionados 2,2g/L de bicarbonato de sódio, 2,4g/L de HEPES e o pH ajustado para 7,0. O meio foi suplementado com 100U/mL de penicilina e 100ug/mL de estreptomicina. A solução foi esterilizada por filtração e acondicionada a 4°C em garrafas previamente esterilizadas. O soro fetal bovino utilizado foi previamente inativado por incubação a 56°C

durante 40min. e foi adicionado ao meio previamente preparado na concentração de 7,5 a 15%.

**DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)** (GIBCO, Grand Island, USA)

O meio pré-sintetizado e liofilizado foi dissolvido em água Milli-Q. Foram adicionados 3,7g/L de bicarbonato de sódio, 2,4g/L de HEPES e o pH ajustado para 7,0. O meio foi suplementado com 100U/mL de penicilina e 100ug/mL de estreptomicina. A solução foi esterilizada por filtração e acondicionada a 4°C em garrafas esterilizadas. O soro fetal bovino utilizado foi previamente inativado por incubação a 56°C durante 40min. e adicionado ao meio previamente preparado na concentração de 10%.

**IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)** (GIBCO, Grand Island, USA)

O meio pré-sintetizado e liofilizado foi dissolvido em água Milli-Q. Foram adicionados 3,024g/L de bicarbonato de sódio. O meio foi suplementado com 100U/mL de penicilina e 100ug/mL de estreptomicina. A solução foi esterilizada por filtração e acondicionada a 4°C em garrafas previamente esterilizadas.

**RPMI-140 (*Roswell Park Memorial Institute*)** (GIBCO, Grand Island, USA)

O meio pré-sintetizado e liofilizado (desprovido do aminoácido metionina) foi dissolvido em água Milli-Q. Foram adicionados 2,0g/L de bicarbonato de sódio, 2,6g/L de HEPES e o pH ajustado para 7,0. O meio foi suplementado com 100U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina e 0,29g/L de L-glutamina. A solução foi esterilizada por filtração e acondicionada a 4°C em garrafas previamente esterilizadas.

**RPMI-1640** (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

O meio pré-sintetizado e liofilizado foi dissolvido em água Milli-Q. Foram adicionados 2,0g/L de bicarbonato de sódio, 2,6g/L de HEPES e o pH ajustado para 7,0. O meio foi suplementado com 100U/mL de penicilina, 100ug/mL de estreptomicina e 0,29g/L de L-glutamina. A solução foi esterilizada por filtração e acondicionada a 4°C em garrafas previamente esterilizadas. O soro fetal bovino utilizado foi previamente inativado por incubação a 56°C durante 40min. e adicionado ao meio previamente preparado na concentração de 5%.

### **3.5 – MEIOS PARA A DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

#### **Meio para diferenciação em Adipócitos**

O meio utilizado foi o  $\alpha$ -MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1 $\mu$ M de dexametasona, 10 $\mu$ g/mL de insulina e 100 $\mu$ M de indometacina.

#### **Meio para diferenciação em Osteócitos**

O meio utilizado foi o  $\alpha$ -MEM suplementado com 7,5% de soro fetal bovino, 0,1 $\mu$ M de dexametasona, 200 $\mu$ M de ácido ascórbico e 10mM de  $\beta$ -glicerolfosfato.

#### **Meio para diferenciação em Condrócitos**

O meio utilizado foi o DMEM, isento de soro fetal bovino, 1 $\mu$ M de dexametasona, 100 $\mu$ M de piruvato de sódio, 0,2% de albumina humana, 50 $\mu$ M de ácido ascórbico e 100ng/mL de TGF- $\beta$ 3.

### **3.6 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOCÍTICA *IN VITRO***

#### **3.6.1 – Isolamento das CTM da medula óssea**

Foram colhidos 4 a 5mL de medula óssea por punção da crista ilíaca de doadores. O material foi acondicionado em tubo contendo anticoagulante EDTA e processado no laboratório de Biologia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto.

##### **3.6.1.1 – Separação das células mononucleares**

As células mononucleares foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (BOYUM, 1968). As amostras foram acondicionadas em tubos cônicos de polipropileno de 50mL e diluídas com PBS 1X até completar 30mL. Foram acrescentados lentamente 13mL do reagente Ficoll no fundo de cada tubo. As amostras foram submetidas à centrifugação a 911xg durante 30min. a T.A. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um novo tubo. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação com PBS 1X a 328 x g durante 10min. a T.A. (temperatura ambiente). Após a contagem em

câmara de Neubauer na presença da solução de Türk, as células mononucleares da medula óssea foram distribuídas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> (1 a 4x10<sup>7</sup> células/garrafa) contendo 15mL de meio de cultivo  $\alpha$ -MEN com 15% (v/v) de soro fetal bovino. As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.6.1.2 – Seleção das células aderentes**

Foi utilizado o protocolo clássico de expansão das CTM por aderência em plástico (FRIEDENSTEIN e cols., 1976), seguida de sucessivas passagens celulares para o enriquecimento da população mesenquimal. Após 3 a 7 dias, o meio de cultivo foi trocado e desta maneira as células não aderentes foram removidas, permitindo a expansão da fração celular aderente. A metade do meio de cultivo foi trocada duas vezes a cada 10 dias. Quando as células alcançaram a confluência de 60 a 100% foram removidas pela adição de tripsina-EDTA 1X e replaqueadas na concentração de 2x10<sup>5</sup> células/garrafa.

## **3.6.2 – Isolamento das CTM da retina e dos tecidos fetais**

### **3.6.2.1 – Digestão do tecido**

Os tecidos foram macerados, cortados em pedaços pequenos e incubados com aproximadamente 10mL de uma solução de colagenase 0,5% (m/v) em PBS 1X durante 30min. a 37°C. Após a digestão do tecido, o meio de cultivo RPMI contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino foi adicionado à suspensão celular para bloquear a ação da enzima. A suspensão celular foi coletada e lavada duas vezes por centrifugação com meio de cultivo RPMI contendo 5% (v/v) de soro fetal bovino a 328xg durante 10min. a T.A. As células foram cultivadas em garrafa plástica de 75cm<sup>2</sup>, com meio  $\alpha$ -MEN contendo 15% (v/v) de soro fetal bovino, em estufa úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.6.2.2 – Seleção das células aderentes**

A seleção das células aderentes foi realizada como descrito em 3.6.1.2.

## **3.6.3 – Caracterização das CTM isoladas**

### **3.6.3.1 – Caracterização morfológica**

Ao longo do período de cultivo, a morfologia das células-tronco isoladas da medula óssea e da retina humanas foi observada por meio do microscópio óptico com a utilização do microscópio invertido Olympus IX50 (Olympus, Melville, USA) e as células foram fotografadas com a utilização da câmera *Hamamatsu Orca ER CCD* (Olympus, Melville, USA).

O cultivo celular também foi realizado sobre lamínulas, previamente esterilizadas por incubação durante 2h. a 180°C, em placas de 24 poços, na concentração  $1 \times 10^5$  células/poço. Após 48 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas pela adição de 1mL de paraformaldeído 2% durante 30min. a T.A. Em seguida, foi realizada a coloração com 500µL de solução de Leishman por 3min. a T.A., e o material foi processado para a análise em microscopia de luz.

### **3.6.3.2 – Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo**

Para a caracterização imunofenotípica das células-tronco isoladas foi utilizado um painel contendo 15 anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos específicos na membrana das células. A maioria dos anticorpos utilizados são conjugados com uma molécula fluorescente; ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC), como mostra a tabela 1 em 3.3.3.4. As células utilizadas neste experimento encontravam-se na 3ª passagem.

Para a marcação das células, cada alíquota de 100µL contendo  $1 \times 10^5$  células em PBS 1X foi encubada com um anticorpo conjugado com fluorocromo. A incubação ocorreu a T.A., durante 20min., ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação com PBS 1X a 300xg durante 3min. As alíquotas de células marcadas com anticorpos não conjugados foram submetidas a uma segunda etapa de marcação; foram incubadas com anticorpos secundários anti-imunoglobulina de camundongo conjugados com FITC (a T.A., durante 20min., ao abrigo da luz) e lavadas duas vezes. Após a marcação, as células foram analisadas pelo aparelho FACSort (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) com a utilização do software *CellQuest* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Para cada análise foram adquiridos 10.000 eventos.

### **3.6.3.3 – Ensaios de diferenciação celular**

A multipotencialidade das células-tronco isoladas foi investigada avaliando o potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. As células utilizadas neste experimento encontravam-se na 3ª passagem.

### ***Adipócitos e osteócitos***

Alíquotas contendo 40.000 células foram distribuídas e cultivadas em placas de 24 poços (3,6cm<sup>2</sup>), com lamínula estéril, para a posterior diferenciação em adipócitos e osteócitos. As células foram cultivadas com meio  $\alpha$ -MEN contendo 15% (v/v) de soro fetal bovino, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A metade do meio de cultivo foi trocada uma vez a cada 7 dias. As diferenciações foram iniciadas quando as células atingiram 60 a 80% de confluência. Os meios indutores da adipogênese e da osteogênese estão descritos em 3.5. A metade dos meios indutores foi trocada duas vezes a cada 7 dias. O meio de troca utilizado continha o dobro da concentração dos agentes indutores. As células apresentaram morfologia característica de adipócitos aproximadamente 15 dias após o início da diferenciação, e morfologia característica de osteócitos aproximadamente 20 a 30 dias após, quando foram coletadas e preparadas para as análises.

### ***Condrócitos***

Alíquotas contendo 1x10<sup>6</sup> células foram submetidas à centrifugação durante 10min. a 328xg para que formassem um botão celular. O sobrenadante foi retirado e, ao botão celular, foi adicionado o meio de diferenciação condrocítica descrito em 3.5. A metade do meio foi trocada duas vezes a cada 7 dias. O meio de troca utilizado continha o dobro da concentração dos agentes indutores. Após 15 dias do início da diferenciação o botão celular apresentou-se maior em tamanho e com uma estrutura mais firme, quando foi coletado e preparado para as análises.

#### **3.6.3.3.1 – Análise citoquímica da diferenciação em adipócitos: coloração com Sudan II - Escarlate**

As células diferenciadas em adipócitos e as células não diferenciadas usadas como controle foram fixadas em paraformaldeído a 4% (m/v) durante 20min. a T.A. Em seguida, o material foi lavado em água destilada e incubado em etanol 70% (v/v) durante 3min. Após esse período foi feita a coloração com a solução Sudan II – Escarlate durante 5min. O material foi lavado em etanol 70% (v/v), lavado em água corrente e, finalmente, contra-corado com a solução de Hematoxilina de Harris durante 2min. Após rápida lavagem em água, o material foi montado em glicerol 70% (v/v), selado com esmalte para unhas e analisado em microscopia de luz utilizando o microscópio Axioskop 2.0 (Carl Zeiss, São Paulo, Brasil). As imagens foram capturadas com a câmara digital AxioCam (Carl Zeiss, São Paulo, Brasil) e analisadas com o auxílio do software AxioVision 3.0 (Carl Zeiss, São Paulo, Brasil).

### **3.6.3.3.2 – Análise citoquímica da diferenciação em osteócitos: coloração com Von Kossa**

As células diferenciadas em adipócitos e as células não diferenciadas usadas como controle foram fixadas em paraformaldeído a 4% (m/v) durante 20min. a T.A. O excesso do fixador foi retirado por meio da lavagem com água destilada. Em seguida, o material foi corado com a solução de nitrato de prata a 5% (m/v) durante 30min. ao abrigo da luz, e exposto à luz de uma lâmpada branca de 100W durante 60min. em uma superfície branca. Depois de corado, o material foi incubado rapidamente com tiosulfato de sódio a 5% (m/v) (1 a 2min.), lavado em água destilada, contra-corado com a solução de Hematoxilina de Harris e novamente lavado em água destilada. Para a montagem de lâminas permanentes foi realizada a desidratação e posterior diafanização do material. As células foram desidratadas utilizando um gradiente crescente de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) (v/v) por incubação durante 1min. em cada solução. Em seguida, o material foi incubado por 1min. em uma mistura 1:1 (v/v) de etanol e xilol e, posteriormente, incubado por 1min. em xilol por 3 vezes. A montagem das lâminas foi realizada em resina sintética Permunt SP-15 e a análise foi feita em microscopia de luz utilizando o microscópio Axioskop 2.0. As imagens foram capturadas com a câmara digital AxioCam e analisadas com o auxílio do software AxioVision 3.0.

### **3.6.3.3.3 – Análise imuno-histoquímica da diferenciação em condrócitos**

O botão celular diferenciado em condrócitos foi lavado com PBS 1X e fixado em formol 4% tamponado (v/v) durante 2 horas. As colorações histoquímicas e as marcações imuno-histoquímicas seguiram os protocolos de rotina do Laboratório de Patologia do Dr. Luciano Neder da FMRP/USP, utilizando a técnica de coloração com Hematoxilina-eosina, e a técnica de Estreptavidina-biotina para a revelação da reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-colágeno tipo II.

As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo, um tecido positivo para colágeno tipo II (fragmento orelha humana) e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado na ausência de anticorpo primário e o segundo na ausência de anticorpo secundário durante os passos da reação.

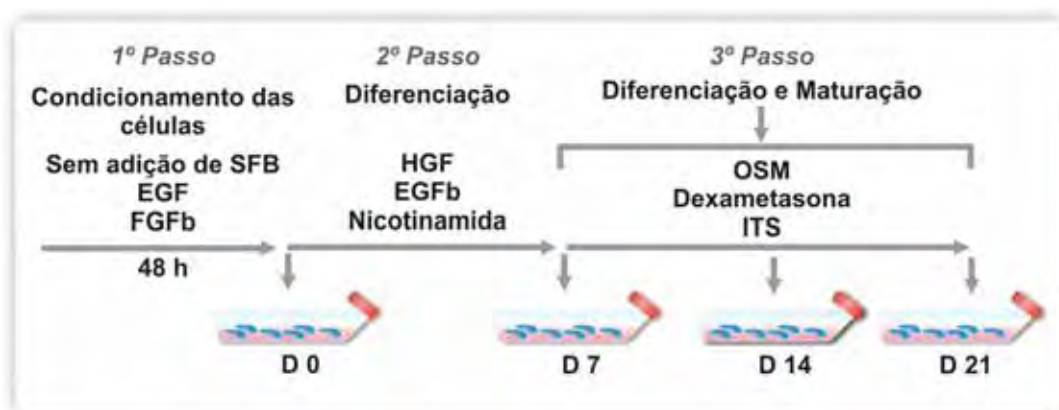
A análise foi feita em microscopia de luz utilizando o microscópio Axioskop 2.0. As imagens foram capturadas com a câmara digital AxioCam e analisadas com o auxílio do software AxioVision 3.0.



### 3.6.4 – Aplicação do protocolo diferenciação hepatocítica

O protocolo de indução hepatocítica (LEE e cols., 2004), cujo esquema é demonstrado na figura 1, foi aplicado nas células isoladas da medula óssea da retina para testar a capacidade das mesmas de se diferenciarem em células com características morfológicas e funcionais de hepatócitos. O protocolo baseia-se na adição de fatores exógenos com a finalidade de mimetizar estímulos conhecidos no processo de embriogênese. As células utilizadas neste experimento encontravam-se na 3ª passagem.

As células foram distribuídas e cultivadas em placas de 24 poços (3,6cm<sup>2</sup>) contendo lamínula estéril (40.000 células/poço), em placas de 100 mm<sup>2</sup> (2x10<sup>5</sup> células/placa) e em garrafas de 75cm<sup>2</sup> (2x10<sup>5</sup> células/garrafa) com meio  $\alpha$ -MEN contendo 15% (v/v) de soro fetal bovino, em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A metade do meio de cultivo foi trocada uma vez a cada 7 dias. No momento em que as células atingiram a confluência de 60 a 80%, o protocolo de diferenciação hepatocítica foi iniciado com a retirada total do meio de cultivo e posterior lavagem das células com PBS 1X por duas vezes, para retirar todo o soro fetal bovino do ambiente celular. Em seguida, o meio IMDM contendo 20ng/mL de EGF e 10ng/mL de FGFb foi adicionado e desta maneira as células foram privadas de soro fetal bovino durante 2 dias, interrompendo a proliferação. Passado esse período, todo o meio foi retirado e o meio IMDM contendo 20ng/mL de HGF, 10ng/mL de FGFb e 0,6g/L de nicotinamida foi adicionado. Durante 7 dias as células permaneceram com o meio de diferenciação, que foi trocado apenas uma vez. Passada a primeira semana, todo o meio foi retirado e o meio IMDM contendo 20ng/mL de OSM, 1 $\mu$ Mol/L de dexametasona e 50ng/mL de ITS *Premix* foi adicionado. Durante até 28 dias as células permaneceram com esse meio, descrito como meio de maturação, que foi trocado uma vez a cada 7 dias.



**Figura 1:** Representação esquemática do protocolo de diferenciação hepatocítica (modificado de Talens-VISCONTI e cols., 2006)

### 3.6.5 – Análise morfológica das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica

Ao longo do período de indução a diferenciação hepatocítica a morfologia das células foi observada por meio do microscópio óptico com a utilização do microscópio invertido Olympus IX50 e as células foram fotografadas com a utilização da câmera *Hamamatsu Orca ER CCD*.

### 3.6.6 – Análise imunofenotípica das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica por citometria de fluxo

Foi realizada a marcação das células com os 15 anticorpos, que reconhecem antígenos específicos na membrana celular, e a posterior análise por citometria de fluxo, como já descrito em 3.6.3.2.

### 3.6.7 – Análise molecular das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica por RT-PCR em tempo real

#### 3.6.7.1 – Extração do RNA total das amostras por meio da metodologia do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol)

A metodologia foi descrita em 1987 por Chomczynski e Sacchi. Aproximadamente  $2 \times 10^5$  células, contidas em placas de  $100 \text{ mm}^2$ , tiveram o meio de cultivo ou de diferenciação retirado e foram lavadas por 2 vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram coletadas com 750  $\mu\text{L}$  do reagente Trizol, acondicionada em tubos plásticos, cônicos, com capacidade

para 1,5uL tratados com DEPC e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após a coleta das amostras em todos os pontos da diferenciação hepatocítica (dias 2, 7, 14, 21 e 28), as células foram descongeladas a T.A. e foi adicionado 5uL de glicogênio a 20ug/uL (v/v). Durante 5min. as amostras descansaram a T.A. e após 10seg. sob forte agitação, foi adicionado 200uL (v/v) de clorofórmio. Seguiu-se a centrifugação durante 5min. a 328xg. A fase aquosa das misturas foram acondicionadas em novos tubos e o mesmo volume de isopropanol gelado foi adicionado. As misturas permaneceram O.N. a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Na manhã seguinte, após centrifugação a 328xg durante 15min. a T.A., os sobrenadantes foram removidos e os precipitados foram lavados por centrifugação com 500uL de etanol gelado (v/v). Os sobrenadantes foram novamente removidos e os precipitados, após secagem durante aproximadamente 15min. a T.A., foram diluídos em 20uL de água tratada com DEPC.

A concentração das amostras de RNA foi estimada pela leitura da absorbância em 260nm, realizada no espectrofotômetro (Milton Roy, Ivyland, USA). Uma D.O. (densidade óptica) corresponde a 40ug/mL de RNA.

### **3.6.7.2 – Reação de transcrição reversa**

A transcrição reversa foi realizada com a utilização do *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com as instruções do fabricante. A mistura reacional de volume final 50uL continha 2ug de RNA, 5uL de Buffer RT 10X, 5uL de RT Random Primers 10X, 4uL de dNTPs 25X, 0,15uL RNase Inibitor (3U v/v), 33,35uL de água tratada com DEPC e 2,5uL MultiScribe Reverse Transcriptase (125U v/v).

### **3.6.7.3 – RT-PCR em tempo real**

A técnica de RT-PCR em tempo real é usualmente aplicada para quantificar de maneira relativa a expressão do gene de interesse. No caso da diferenciação hepatocítica os genes selecionados foram o da albumina (ALB), citoqueratina 18 (CK18) e citoqueratina 19 (CK19), que são conhecidos como marcadores de células hepáticas.

Para a realização da técnica foram utilizados os *kits* SYBR Green PCR Master Mix e TaqMan Universal PCR Master Mix e o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Para a análise dos resultados utilizamos a quantificação relativa aplicando o método comparativo. Esta análise é baseada no ciclo no qual a cinética de amplificação cruza um ponto definido chamado de *threshold* ( $C_T$ ). Para a aplicação do método comparativo é necessária a amplificação de um gene de controle endógeno que funciona como

um calibrador para a quantidade de RNA adicionada na reação. Neste estudo, utilizamos o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno.

Para a quantificação relativa pelo método comparativo, os valores obtidos são relativos ao valor encontrado em uma amostra de referência chamada de calibrador. Neste trabalho, para a análise das CTM induzidas à diferenciação hepatocítica, foram utilizadas como calibradores as amostras de CTM não induzidas. Para a análise das CTM não induzidas à diferenciação foram utilizadas como calibradores amostras de células estreladas do fígado adulto. Primeiro, o  $C_T$  de gene de interesse e o  $C_T$  do gene de controle endógeno (GAPDH) são determinados para cada amostra. As diferenças entre os  $C_{Ts}$  do gene alvo e do controle ( $\Delta C_T$ ) são calculadas para normalizar as diferenças da quantidade de RNA adicionada na reação e da eficiência desta. O  $\Delta C_T$  de cada amostra experimental é subtraído do  $\Delta C_T$  do calibrador. O valor desta diferença é denominado de  $\Delta\Delta C_T$ . Este valor é aplicado na fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  usada para calcular a quantidade do gene de interesse normalizado em relação à quantidade do gene de controle endógeno, e relativo à quantificação da expressão do gene de interesse com o calibrador. Como resultado, os valores obtidos nas amostras experimentais são expressos como o número de vezes da diferença entre a quantidade de RNA da amostra experimental em relação ao calibrador.

Para a amplificação do gene ALB foi utilizada uma sonda específica acoplada a um marcador fluorescente (FAM), que foi pré-desevolvida pelo fabricante para ensaios TaqMan, cuja seqüência pode ser encontrada no *site* do mesmo. Para que o gene GAPDH pudesse ser utilizado como controle endógeno do gene ALB, GAPDH também foi detectado por uma sonda TaqMan. A mistura reacional de volume total 15 $\mu$ L continha 0,75 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (5 $\mu$ M), 2,47  $\mu$ L de água, 5,0 $\mu$ L do TaqMan PCR Master mix e 2,0 $\mu$ L da diluição 1:5 do cDNA.

O desenho dos oligonucleotídeos para a amplificação dos genes CK18, CK19 e GAPDH foi realizado pelo software *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). As seqüências estão descritas na tabela 3 na seção III.3.3.6. A mistura reacional de volume total 15 $\mu$ L continha 0,75 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (10 $\mu$ M), 7,75 $\mu$ L de água, 3,75 $\mu$ L do SYBR Green PCR Master mix e 2,0 $\mu$ L da diluição 1:5 do cDNA.

As reações foram colocadas em microplacas de 96 poços e seladas com tampas ópticas (Applied Biosystems, Foster City, USA). As condições de amplificações foram 2min. a 50°C e 10min. a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 95°C durante 15seg. e 60°C durante 1min. Todas as

reações realizadas para a quantificação dos genes foram feitas em duplicatas. As curvas de eficiência dos oligonucleotídeos usados nas reações de SYBR foram feitas em triplicata.

### **3.6.8 – Análise das células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica por imunofluorescência**

Lamínulas contendo as células submetidas ao protocolo de diferenciação hepatocítica, acondicionadas em placas de 24 poços, foram lavadas duas vezes com PBS 1X e fixadas em paraformaldeído 2% (m/v) durante 15min. Após mais duas lavagens, as células foram submetidas ao bloqueio dos aldeídos do fixador pela adição da solução de glicina 0,01M durante 5min. As células foram lavadas mais duas vezes e permeabilizadas com a solução de triton 0,3% (v/v) durante 15min. Três lavagens se seguiram e as células foram submetidas ao bloqueio dos sítios inespecíficos durante 60min. com a solução de bloqueio. Passado esse período, o material foi novamente lavado por duas vezes e submetido à marcação com 10ug/mL dos anticorpos primários, durante 60min. a T.A. A segunda marcação foi realizada com 1ug/mL dos anticorpos conjugados com moléculas fluorescentes, ao abrigo da luz, durante 30min. Os anticorpos estão representados na tabela 2 em 3.3.3.4. Entre a primeira e a segunda incubação, e após a segunda incubação, o material foi lavado de 5 a 10 vezes. O núcleo das células marcadas foi corado com a solução de DAPI 1:100 (v/v) e as lamínulas foram posteriormente retiradas dos poços, passadas em água destilada e montadas em Fluoromont-G. A análise foi feita em microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axioskop 2.0. As imagens foram capturadas com a câmara digital AxioCam e analisadas com o auxílio do software AxioVision 3.0.

### **3.6.9 – Análise das CTM da medula óssea não induzidas à diferenciação hepatocítica para a produção de albumina**

#### **3.6.9.1 – Marcação das células em cultivo com metionina [ S35]**

As células foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de  $2 \times 10^5$ /poço. Após a aderência ao plástico, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas por 2 vezes com PBS 1X, e 4mL de meio de cultivo desprovido de metionina (RPMI 140), sem SFB, foi adicionado. Passada 1h., 150 uCi de metionina radioativa foi adicionada e as células foram encubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. O sobrenadante foi recolhido e congelado a - 20°C para a posterior análise da presença de albumina.

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e concentradas por meio da passagem na coluna Centriplus YM-10 (Millipore, Bedford, USA) de acordo com as instruções do fabricante, atingindo o volume de aproximadamente 300uL. A concentração de proteína nas amostras foi quantificada por análise colorimétrica com a utilização da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976).

### **3.6.9.2 – Imunoprecipitação com o anticorpo anti-albumina**

Foi adicionado 100uL da resina N-protein A Sepharose 4 Fast Slow (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) em tubos plásticos, cônicos, com capacidade para 1,5mL. Após a sedimentação, o sobrenadante foi retirado e a resina foi lavada 2 vezes com PBS 1X pH 8.0 por centrifugação a 14.000rpm, durante 5min. Em seguida, a resina foi ressuspensa com 200uL de amostra e com 200uL da diluição do anticorpo anti-albumina em PBS 1X pH 8.0, em tubos diferentes, separadamente. Seguiu-se a incubação a T.A. sob agitação constante durante 1h. Os tubos contendo resina + anticorpo anti-albumina foram novamente lavados 2 vezes e o sobrenadante foi descartado. Os tubos contendo resina e amostra foram centrifugados para a sedimentação da resina e o sobrenadante destes tubos foram adicionados aos tubos contendo resina e anticorpo anti-albumina. Após a homogeneização seguiu-se a incubação a 4°C sob constante agitação O.N. As amostras foram então lavadas e o sobrenadante foi descartado.

### **3.6.9.3 – Gel de poliacrilamida – SDS-PAGE**

As amostras marcadas com metionina radioativa (proteínas totais e proteínas resultantes da imunoprecipitação com o anticorpo anti-albumina) foram misturadas com o tampão de amostra (15uL de amostra + 5uL do tampão de amostra) e submetidas ao aquecimento durante 5min. em água fervente.

O sistema X-Cell Surelock Mini Cell foi montado de acordo com as instruções do fabricante e as amostras foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 150V durante aproximadamente 80min. O gel foi corado com a solução de azul brilhante de Coomassie O.N. e posteriormente descorado por 4h. Para a secagem do gel foi utilizado o sistema *DryEase* de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.6.9.4 – Revelação da marcação radioativa

Os géis foram expostos aos filmes de raio-x em cassetes apropriados durante 2, 24 e 72 horas. A auto-radiografia foi revelada na processadora X-Omat (Kodak, Rochester, USA) localizada na câmara escura do departamento de radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

## 3.7 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DE CTM DA MEDULA ÓSSEA PARA O TECIDO HEPÁTICO *IN VIVO*

### 3.7.1 – Indução do dano hepático por meio da administração de CCl<sub>4</sub>

O CCl<sub>4</sub> é um hepatotóxico clássico cuja administração causa dano agudo reversível caracterizado por necrose centrolobular. A metabolização do CCl<sub>4</sub> é dependente de citocromo P450 e resulta na formação de radicais triclorometil altamente reativos. Esses radicais desencadeiam a peroxidação lipídica que irá danificar a membrana das células hepáticas (FARBER e EL-MOFTY; 1975). Este processo é acompanhado pela ativação das células de *Kupffer* que irão secretar quimiotaxinas e ativadores de neutrófilos (EDWARDS e cols., 1993). O influxo de neutrófilos irá promover um extenso dano tecidual.

O dano hepático pode ser induzido em camundongos pela administração intraperitoneal de uma única dose de CCl<sub>4</sub> (0,1mL/Kg) diluído em óleo de milho (BRUCCOLERI e cols., 1997). Trabalhos mais recentes preconizam a administração de aproximadamente 0,4mL/Kg da droga (SEO e cols., 2005). O modelo de dano hepático causado pela administração de CCl<sub>4</sub> é amplamente utilizado em experimentos *in vivo* que investigam a capacidade das células-tronco de migrar e permanecer no fígado danificado, bem como a capacidade de participar ou viabilizar a regeneração.

Neste trabalho, o CCl<sub>4</sub> foi administrado nos camundongos via intraperitoneal e concentrações diferentes foram testadas.

### 3.7.2 – Infusão de CTM em camundongos da linhagem NOD-SCID portadores de dano hepático induzido

Aproximadamente 150µL da suspensão contendo  $1 \times 10^6$  CTM isoladas da medula óssea de um doador masculino foram infundidos na veia caudal lateral de camundongos fêmeas imunodeficientes previamente tratados com CCl<sub>4</sub>.

### **3.7.3 – Análise dos camundongos**

Para as análises, os animais foram anestesiados por meio da inalação de éter etílico e aproximadamente 300uL de sangue foi coletado do plexo orbital. Os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical e os fígados foram retirados.

#### **3.7.3.1 - Análise histológica do fígado**

Uma parte dos fígados foi acondicionada em frasco contendo formol tamponado 10% (v/v) pH 7.4 e encaminhada para o Laboratório de Patologia da FMRP/USP, onde foi incluída na parafina, cortada e corada. Os cortes foram realizados com 3µm de espessura utilizando o micrótomo AO 820 Spencer (PEMED, Denver, USA), em lâminas previamente silanizadas. As células foram coradas por Hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz, utilizando o microscópio Axioskop 2.0. As imagens foram capturadas com a câmara digital AxioCam.

#### **3.7.3.2 - Determinação quantitativa da atividade das transaminases hepáticas no soro pelo método colorimétrico**

A transaminase glutâmico oxalacética – TGO (aspartato aminotransferase – AST) e a transaminase glutâmico pirúvica – TGP (alanina aminotransferase – ALT) são enzimas encontradas em alta concentração no fígado, mais precisamente no citoplasma e na mitocôndria das células hepáticas. Frente a qualquer tipo de lesão tecidual, as células hepáticas liberam uma grande quantidade dessas enzimas na corrente sanguínea, aumentando as suas concentrações no soro.

A atividade da TGO e da TGP foi determinada no soro dos animais pelo método colorimétrico (REITMAN e FRANKEL, 1957) para a caracterização do dano hepático induzido com a utilização dos respectivos *kits*, de acordo com as instruções do fabricante. O sangue dos camundongos foi centrifugado a 800xg durante 10 min., separado e congelado a – 20°C. Minutos antes de serem submetidos às análises, os soros foram descongelados a T.A.

#### **3.7.3.3 - Análise do tecido hepático para a presença de células humanas**

Duas partes do mesmo fígado foram devidamente identificadas, imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido e acondicionadas a – 80°C.

Para a pesquisa de células masculinas humanas no tecido hepático de camundongos fêmeas foi selecionado o gene SRY (SINCLAIR e cols., 1990), encontrado no cromossomo Y humano, responsável pela caracterização sexual dos indivíduos.



### 3.7.3.3.1 - Extração do DNA genômico

Posteriormente, o material foi descongelado a T.A. e o DNA total foi extraído com a utilização do *kit* DNasy Tissue, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram eluídas em 100uL de água Milli-Q. A concentração das amostras de DNA foi estimada pela leitura da absorbância em 260nm, realizada no espectrofotômetro. Uma D.O. corresponde a 50ug/mL de DNA.

### 3.7.3.3.2 - Nested-PCR para o gene SRY humano

A amplificação do fragmento de interesse na técnica de Nested-PCR é realizada em duas etapas, com a utilização de dois pares de oligonucleotídeos. A primeira reação irá amplificar um fragmento maior, que contém o fragmento de interesse. Na segunda reação, o produto da primeira é utilizado com molde e, desta forma, o fragmento de interesse é amplificado com maior especificidade.

Os oligonucleotídeos foram desenhados de acordo com a seqüência de nucleotídeos depositada no GenBank sob o número de acesso NM003140.1, referente ao RNAm do gene SRY humano. Os oligonucleotídeos estão representados na tabela 4 em 3.3.3.6.

Na primeira etapa de amplificação, a mistura reacional continha 1ug de DNA, 2,5uL de tampão da enzima Taq DNA polymerase 10X, 0,75uL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2uL do oligonucleotídeo P5FAESRY (10pmoles), 2uL do oligonucleotídeo P3FAMESRY (10pmoles), 0,8uL da enzima Taq DNA polymerase (5U/L), 0,5uL da mistura de dNTPs (10mM) e água Milli-Q qsp 25mL. Foram realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 57°C.

Na segunda etapa de amplificação, a mistura reacional continha 5uL do produto da primeira reação, 2,5uL de tampão da enzima Taq DNA polymerase 10X, 0,75uL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2uL do oligonucleotídeo P5FAISRY (10pmoles), 2uL do oligonucleotídeo P3FAMISRY (10pmoles), 0,8uL da enzima Taq DNA polymerase (5U/L), 0,5uL da mistura de dNTPs (10mM) e água Milli-Q qsp 25mL. Foram realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C.

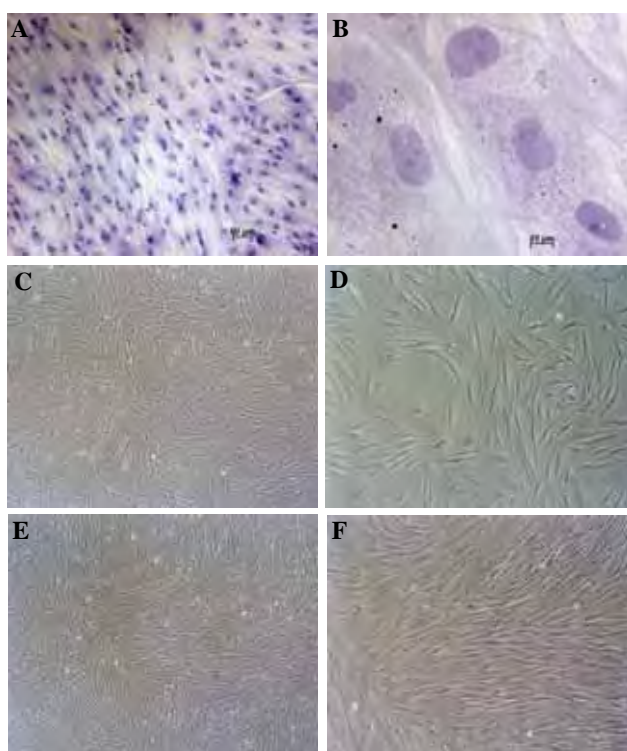
Para a análise dos produtos da PCR, foi realizada eletroforese em gel 1% (m/v) de agarose neutro. A voltagem utilizada foi de 80V por aproximadamente 30min. Posteriormente, os géis foram corados com brometo de etídio e submetidos à visualização em luz U.V. a 302nm. Para a verificação do tamanho do fragmento de DNA foi utilizado o marcador de peso molecular  $\phi$ X174.

## **4 – RESULTADOS**

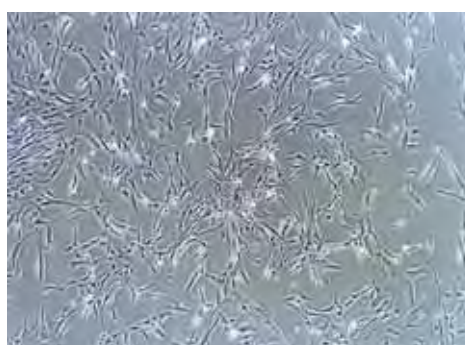
### **4.1 – CARACTERIZAÇÃO DAS CTM ISOLADAS**

#### **4.1.1 - Caracterização morfológica por microscopia de luz**

As células isoladas a partir dos tecidos adultos e fetais apresentaram morfologia fibroblastóide, com o núcleo bem delimitado, dois ou três nucléolos bem evidentes e citoplasma com limites imprecisos. Também apresentaram formação de “tapete celular” quando em alta confluência, como mostram as figuras 2 e 3. Os resultados sugerem que as células isoladas apresentaram características morfológicas de CTM.



**Figura 2:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da medula óssea humana. A) Células com aproximadamente 90% de confluência coradas com Hematoxilina de Harris, aumento de 40X. B) Aumento de 630X. C) Células com aproximadamente 90% de confluência vistas em microscopia de contraste de fase, aumento de 40X. D) Aumento de 100X. E) Células com aproximadamente 50% de confluência vistas em microscopia de contraste de fase, aumento de 40X. F) Aumento de 100X.



**Figura 3:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da retina humana com aproximadamente 50% de confluência vistas em microscopia de contraste de fase, aumento de 40 X.

#### 4.1.2 – Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo

As células isoladas a partir dos tecidos adultos e fetais apresentaram a expressão significativa dos marcadores de CD73, CD105, CD90, CD13, CD29, CD49e, CD54, CD44 e HLA de classe I. Apresentaram expressão baixa ou ausente do HLA-DR, dos marcadores de células hematopoéticas CD34, CD14 e CD45 e dos marcadores de células endoteliais CD51/61, CD31 e KDR. Os resultados mostram que as células isoladas possuem características imunofenotípicas de CTM. A porcentagem de células positivas para cada marcador está representada na tabela 5. Os resultados sugerem que as células isoladas apresentaram características imunofenotípicas de CTM.

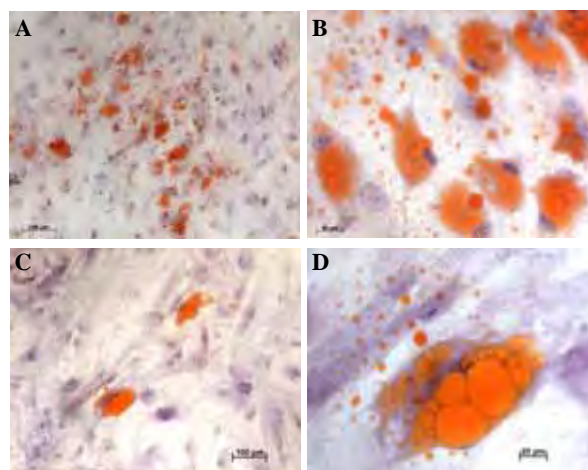
**Tabela 5:** Porcentagem das células isoladas dos tecidos adultos e fetais positivas para os respectivos marcadores de superfície celular.

	CD45	CD14	Classe-I	HLA-DR	CD34	CD73	CD49e	CD51/61	CD44	CD29	CD13	CD90	CD105	KDR	CD54
MO14	0	0	24	3	0	59	66	0	91	81	91	98	6	0	16
MO16	0	0	0	81	0	95	63	ND	77	97	98	98	74	1	1
MO17	0	0	70	0	0	61	60	0	78	84	88	99	86	2	4
MO24	0	0	52	1	0	77	89	2	80	90	94	93	37	0	31
RET2	0	0	68	0	0	73	87	4	82	98	63	96	29	1	32
CAR1	0	1	78	1	8	83	9	38	59	97	74	98	80	6	78
CAR2	0	0	14	0	0	30	45	0	36	75	62	95	67	0	23
CAR3	0	2	62	1	1	71	93	4	60	97	60	98	55	5	36
FAS1	0	0	94	0	1	94	98	25	63	98	92	99	85	5	45
FAS2	0	0	52	0	0	54	92	1	58	93	96	99	3	4	17
FAS3	0	0	47	0	0	48	73	1	47	80	95	99	8	0	13
FAS5	2	0	68	0	0	77	95	8	55	97	93	99	56	1	91
FIG2	0	8	25	0	1	57	83	1	61	97	8	66	39	1	38
FIG3	0	6	87	0	0	39	77	0	50	95	81	98	14	0	70
FIG4	0	5	73	0	0	66	95	38	71	98	95	98	54	0	79
FIG5	0	1	58	0	0	73	89	3	64	96	92	98	96	1	19
FIG6	0	1	5	0	0	22	47	1	86	91	65	95	92	1	78
GON1	0	0	90	1	0	68	89	66	66	98	98	99	95	3	89
GON4	0	0	79	1	0	79	83	0	33	91	46	97	18	3	74
GON5	0	0	84	0	0	66	80	26	41	93	68	97	47	3	90

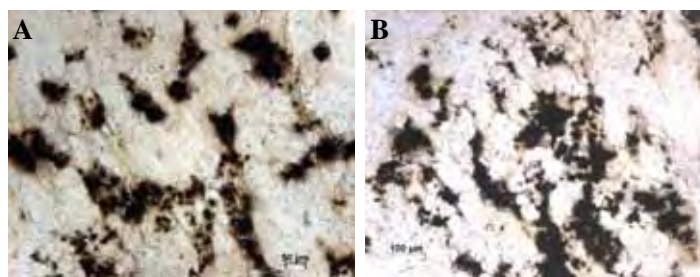
#### 4.1.3 – Ensaios de diferenciação celular

O potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das células isoladas dos tecidos adultos e fetais foi investigado. Quando cultivadas com o meio de diferenciação adipogênica, as células apresentaram gotículas de lipídeos em seu citoplasma que foram coradas com Sudan II – Escarlata (em alaranjado), como mostra a figura 4. Quando cultivadas com o meio de diferenciação osteogênica, as células apresentaram cristais de cálcio em seu citoplasma que foram corados com Von Kossa (em marron), como mostra a figura 5.

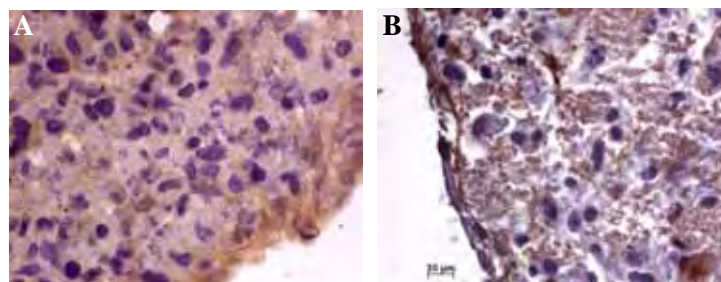
Quando cultivadas com o meio de diferenciação condrogênica, as células apresentaram depósitos de colágeno em seu citoplasma, o que foi evidenciado após a imuno-histoquímica com o anticorpo anti-colágeno II, como mostra a figura 6. Os resultados apresentados sugerem que as células isoladas possuem a capacidade de se diferenciarem em adipócitos, osteócitos e condrócitos, potencial atribuído as CTM.



**Figura 4:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação adipogênica. Coloração com Sudan II – Escarlate e Hematoxilina de Harris. A) Diferenciação adipogênica de células isoladas da medula óssea aumento de 100X, B) Diferenciação adipogênica de células isoladas da medula óssea aumento de 400X, C) Diferenciação adipogênica de células isoladas da retina aumento de 100X, D) Diferenciação adipogênica de células isoladas da retina aumento de 400X.



**Figura 5:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação osteogênica. Coloração com Von Kossa e Hematoxilina de Harris. A) Diferenciação osteogênica de células isoladas da medula óssea aumento de 100X, B) Diferenciação osteogênica de células isoladas da retina aumento de 100X.

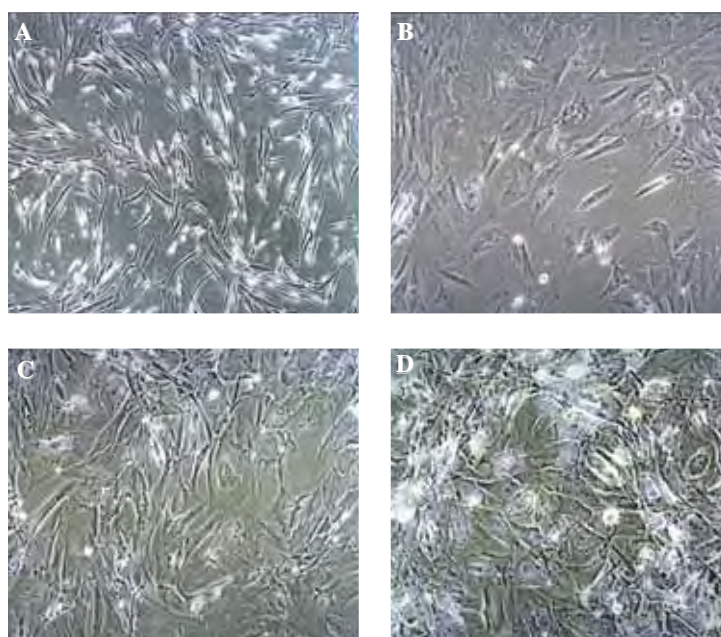


**Figura 6:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação condrogênica. Imunohistoquímica para Colágeno II. A) Diferenciação condrogênica de células isoladas da medula óssea aumento de 630X, B) Diferenciação condrogênica de células isoladas da retina aumento de 630X.

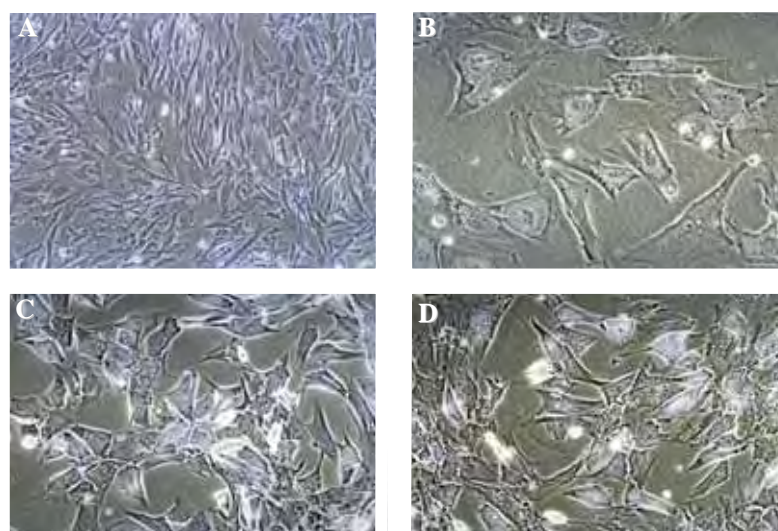
## **4.2 – INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO HEPATOCÍTICA A PARTIR DAS CTM HUMANAS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA E DA RETINA**

### **4.2.1 – Análise morfológica por microscopia de luz**

As células isoladas da medula óssea e da retina, quando induzidas à diferenciação hepatocítica, apresentaram mudanças em sua morfologia. Durante a primeira semana de indução, quando foram cultivadas em meio de diferenciação contendo HGF, as células não apresentaram mudanças significativas, mantendo a morfologia fibroblastóide. A partir da segunda semana de diferenciação, quando as células foram cultivadas em meio contendo OSM, foi observada uma mudança significativa na morfologia, com retração das projeções citoplasmáticas e desenvolvimento de uma morfologia poligonal ao longo do período, como mostram as figuras 7 e 8. Os resultados sugerem que após a indução à diferenciação hepatocítica, as CTM isoladas da medula óssea e da retina sofrem alterações morfológicas e adquirem a forma aproximada de hepatócitos.



**Figura 7:** Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea (MO14) e induzidas à diferenciação hepatocítica, aumento de 100X. A) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 7 dias (D07). B) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 14 dias (D14). C) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias (D21). D) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 28 dias (D28).



**Figura 8:** Microfotografia de CTM isoladas da retina (RET2) e induzidas à diferenciação hepatocítica. A) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 7 dias (D07), aumento de 40X. B) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 14 dias (D14), aumento de 200X. C) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias (D21), aumento de 100X. D) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 28 dias (D28), aumento de 100X.

#### 4.2.2 – Análise imunofenotípica por citometria de fluxo

O perfil imunofenotípico das CTM isoladas da medula óssea foi investigado após a indução com meio de diferenciação hepatocítica nos dias 14, 21 e 28. Foi observada a diminuição da expressão do marcador de CTM CD29 após 21 dias de indução a diferenciação. Porém, esse resultado não se manteve. O marcador CD54 se mostrou aumentados após 28 dias de indução, como mostra a tabela 6. Os resultados sugerem que a metodologia de indução a diferenciação hepatocítica utilizada neste trabalho não alterou o perfil de expressão dos marcadores de CTM nas células analisadas.

**Tabela 6:** Expressão dos marcadores imunofenotípicos nas CTM isoladas da medula óssea (MO 24) antes e depois da diferenciação hepatocítica, em diferentes tempos.

	CD45	CD14	Classe-I	HLA-DR	CD34	CD73	CD49e	CD51/61	CD44	CD29	CD13	CD90	CD105	KDR	CD54
MO24	0	0	52	1	0	77	89	2	80	90	94	93	37	0	31
D14	0	0	92	1	0	97	97	0	97	97	98	99	ND	ND	21
D21	0	0	18	0	0	83	83	0	79	69	98	99	ND	ND	47
D28	0	5	88	1	1	95	95	0	93	97	98	98	56	0	79

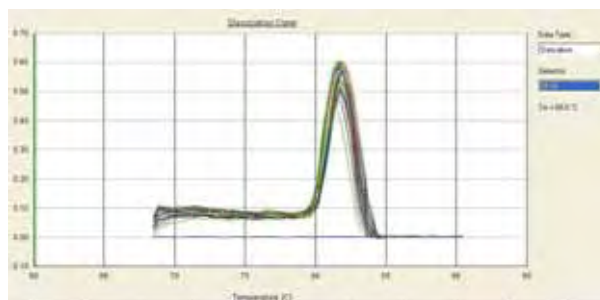
#### 4.2.3 – Análise molecular por RT-PCR em tempo real

Após a extração dos RNAs das células submetidas à indução da diferenciação hepatocítica e das células utilizadas como controle, o cDNA foi confeccionado, diluído e utilizado como molde na reação para a amplificação dos fragmentos de interesse.

##### 4.2.3.1 – Curva de eficiência dos oligonucleotídeos desenhados para a metodologia de SYBR

Para avaliar a eficiência geral de amplificação dos oligonucleotídeos desenhados para os genes CK18, CK19 e GAPDH, foi realizada uma curva. O cDNA de células extraídas do fígado humano foi utilizado um como molde para a amplificação. Os oligonucleotídeos foram utilizados puros e diluídos nas proporções 1:10, 1:100 e 1:1000. As reações foram feitas em triplicata. Como resultado, as curvas de dissociação de CK18, CK19 e GAPDH apresentaram apenas um pico, indicando a formação de apenas um produto de amplificação e inviabilizando a possibilidade de amplificação inespecífica, como mostra a figura 9 para CK18.



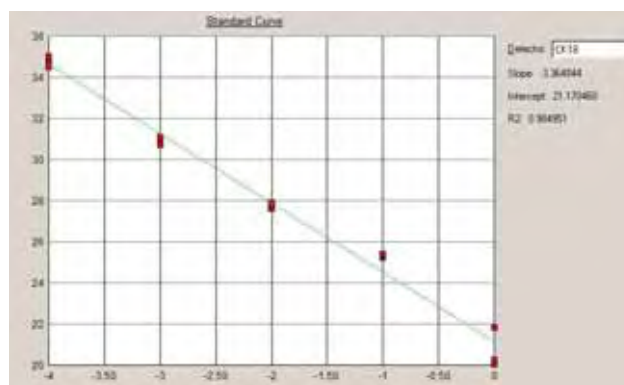


**Figura 9:** Representação gráfica da dissociação do produto amplificado pelos oligonucleotídeos do gene CK18 na RT-PCR em tempo real.

Os *slopes* apresentados pelo *software* foram, respectivamente, 3,39, 3,36 e 3,33. Aplicando-se a fórmula:

$$\text{EFICIÊNCIA GERAL DE AMPLIFICAÇÃO} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

temos que a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos é de 98 % para CK18, 97 % para CK19 e 100 % para GAPDH, como mostra a figura 10 para a CK18.

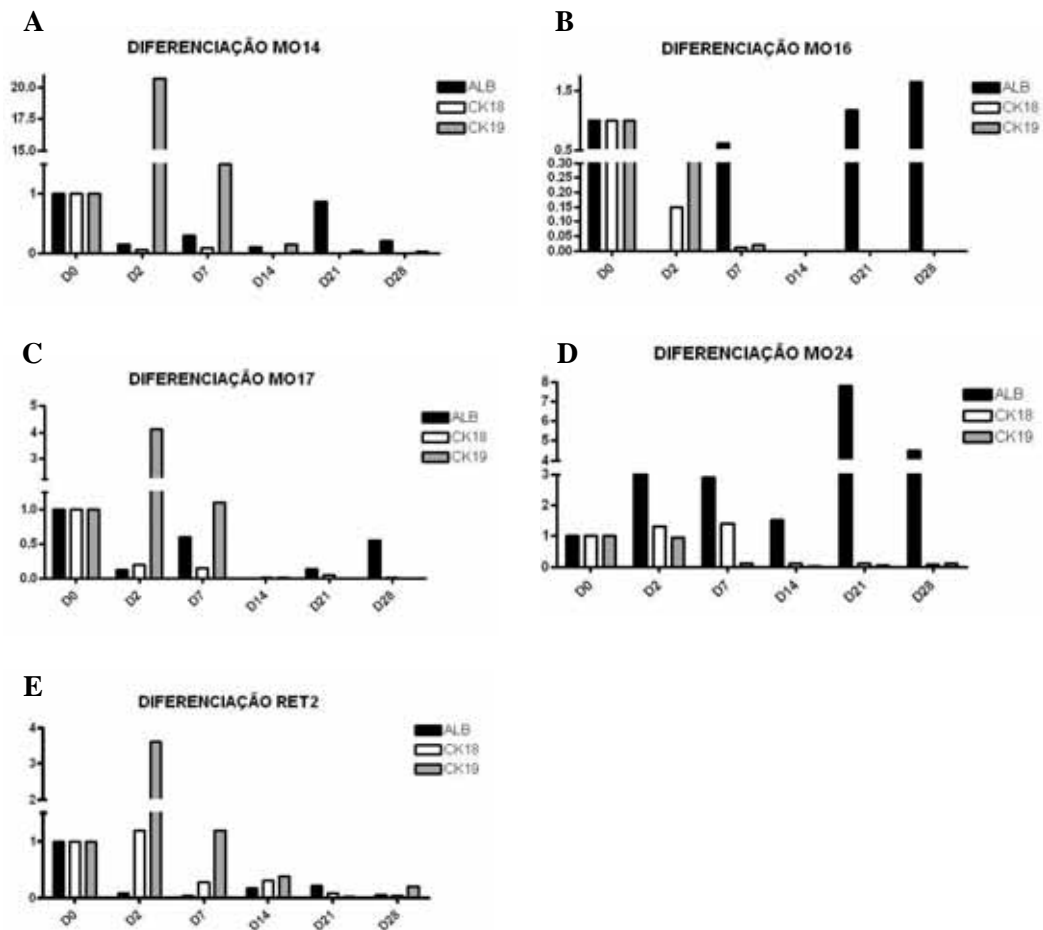


**Figura 10:** Representação gráfica da curva de amplificação dos oligonucleotídeos do gene CK18 na RT-PCR em tempo real.

#### 4.2.3.2 – Análise da expressão dos marcadores hepatocíticos

As células isoladas da medula óssea de 4 doadores (MO14, MO16, MO17 e MO24) e da retina de um doador (RET2) foram analisadas quanto à expressão dos marcadores hepatocíticos ALB, CK18 e CK19 após a indução a diferenciação. Nenhuma das 5 amostras analisadas mostrou o aumento na expressão dos marcadores após 28 dias de indução à

diferenciação. A figura 11 mostra os níveis de expressão dos 3 marcadores hepatocíticos em cada uma das amostras. A expressão em cada tempo (D2, D7, D14, D21 e D28) é comparada à expressão do dia 0, que foi utilizado como calibrador.

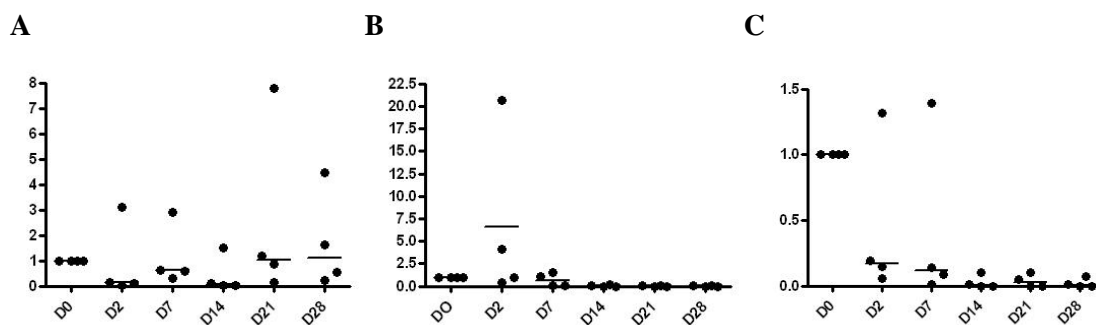


**Figura 11:** Perfil de expressão dos marcadores ALB, CK18 e CK19 nas células induzidas à diferenciação hepatocítica nos diferentes pontos: D2, D7, D14, D21 e D28, analisadas por RT-PCR em tempo real. A) MO14. B) MO16. C) MO17. D) MO24. E) RET2.

A amostra MO14 aumentou 20 vezes a expressão de CK19 no dia 2, com posterior queda. A MO16 aumentou 1,2 vezes a expressão de ALB no dia 21 e 1,6 vezes no dia 28. A MO17 aumentou 4 vezes a expressão de CK19 no dia 2, com posterior queda. A MO24 aumentou 3 vezes a expressão de ALB nos dias 2 e 7, 1,5 vezes no dia 14, 7,8 vezes no dia 21 e 4,5 vezes no dia 28. Esta amostra também aumentou 1,3 vezes a expressão de CK18 nos dias 2 e 7 com posterior queda. Já a RET2 aumentou 1,2 vezes a expressão de CK18 no dia 2,

com posterior queda. Também aumentou 3,6 vezes a expressão de CK19 no dia 2 e 1,2 vezes no dia 7, com posterior queda.

Para que o teste estatístico pudesse ser aplicado, as amostras de CTM isoladas da medula óssea ( $n = 4$ ) foram agrupadas de acordo com a expressão de cada marcador, como mostra a figura 12.



**Figura 12:** Perfil de expressão dos marcadores hepáticos nas 4 amostras de CTM isoladas da medula óssea, induzidas à diferenciação hepatocítica nos diferentes pontos: dia 2 (D2), dia 7 (D7), dia 14 (D14), dia 21 (D21) e dia 28 (D28), analisadas por RT-PCR em tempo real. A) Expressão de ALB, B) Expressão de CK18 e C) Expressão de CK19.

O teste Friedman para análise de variância (ANOVA) foi aplicado às amostras para cada um dos marcadores. Em nenhum dos casos a variação foi estatisticamente significativa.

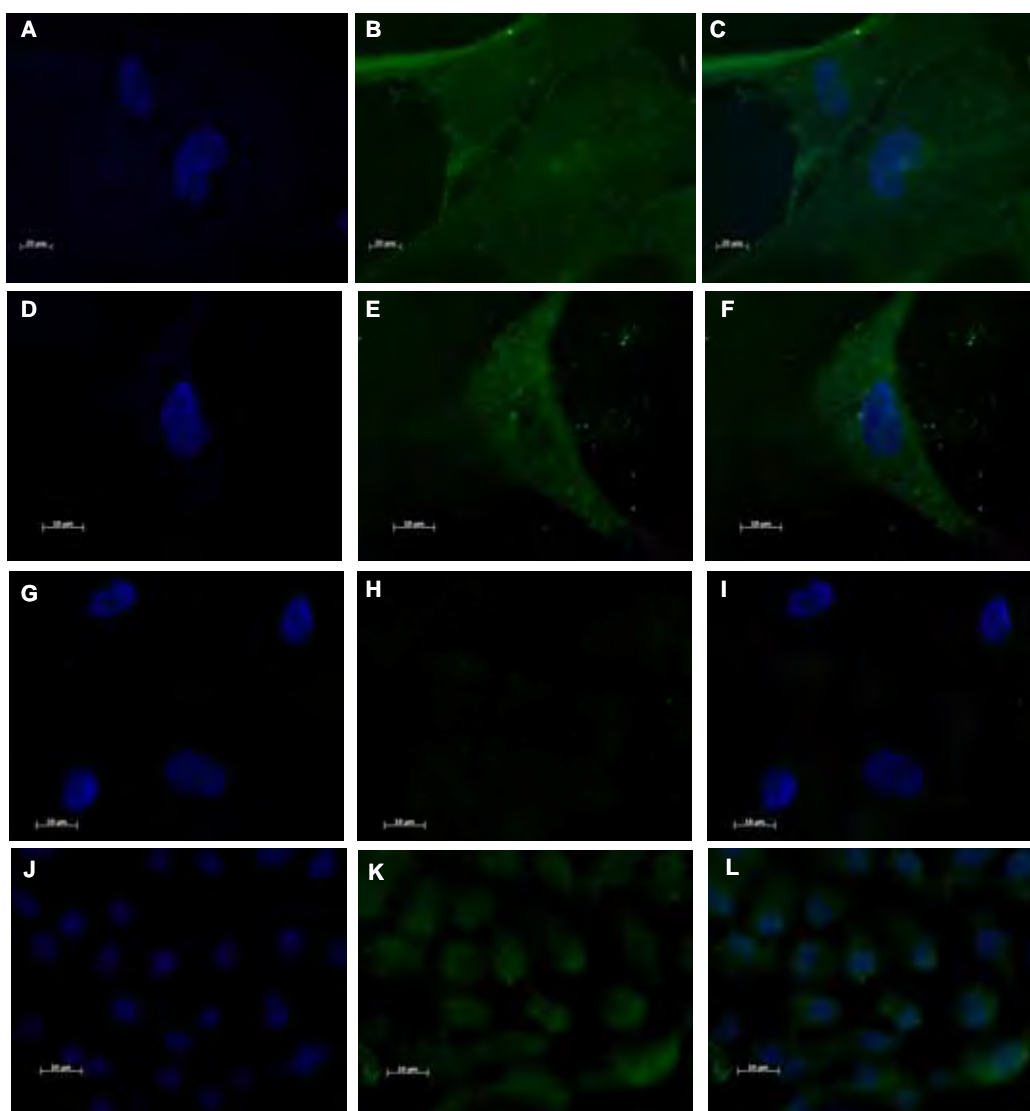
A expressão dos transcritos ALB, CK18 e CK19 foi detectada nas células antes da indução à diferenciação hepatocítica, o que possibilitou o uso das mesmas no dia 0 como calibrador. Aplicando-se a mediana das amostras em cada ponto (D2, D7, D14 e D21) é possível visualizar a queda na expressão dos 3 marcadores hepáticos ao longo do período de indução, o que também acontece com a amostra de células isolada da retina. Esses resultados sugerem que as CTM não se diferenciam em hepatócitos quando induzidas pela metodologia utilizada neste trabalho.

#### 4.2.4 – Análise da produção de marcadores hepáticos por imunofluorescência

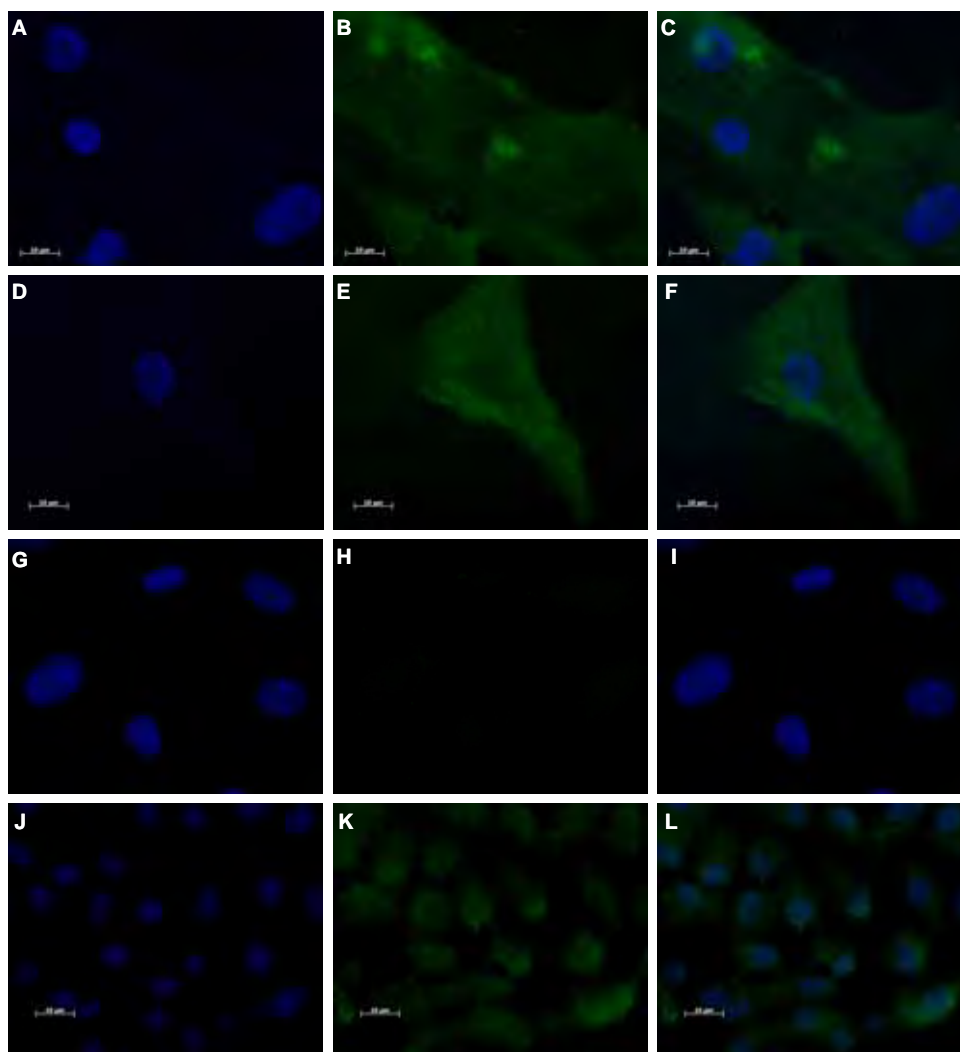
As CTM isoladas da medula óssea (MO14) e da retina (RET2), foram investigadas quanto a produção dos marcadores ALB, CK18 e  $\alpha$ -fetoproteína (AFP) antes e após 21 dias de indução a diferenciação hepatocítica.

### ***Albumina***

As células isoladas da medula óssea apresentaram fraca positividade para a marcação com o anticorpo anti-albumina antes e após a indução à diferenciação, o que foi visualizado após a segunda marcação com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com FITC. As células não apresentaram positividade quando submetidas à marcação apenas com o anticorpo secundário. As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo, como mostra a figura 13. As células isoladas da retina também apresentaram fraca positividade para a marcação com o anticorpo anti-albumina antes e após a indução à diferenciação, o que foi visualizado após a segunda marcação com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com FITC. As células não apresentaram positividade quando submetidas à marcação apenas com o anticorpo secundário. As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo, como mostra a figura 14.



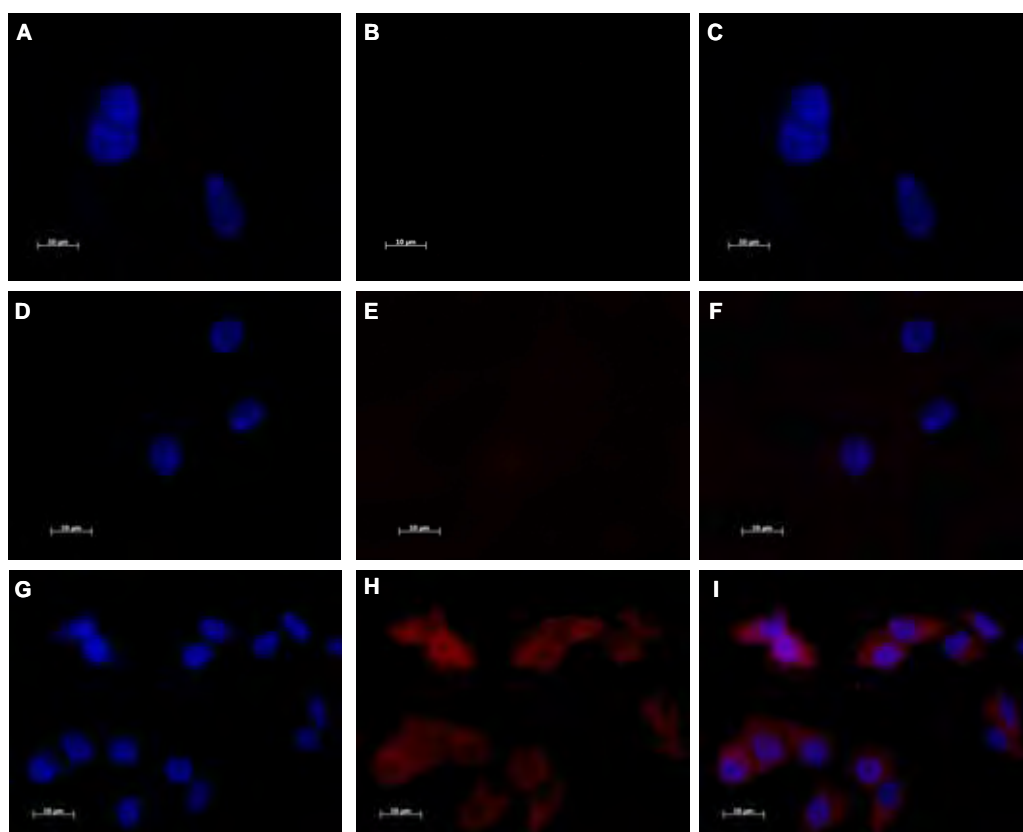
**Figura 13:** Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea (MO14) antes e após 21 dias de indução a diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, aumento de 630X. A – C: Antes da indução à diferenciação, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC, mostrando a expressão de albumina. D – F: Após a indução à diferenciação, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC, mostrando a expressão de albumina. G – I: Antes da indução à diferenciação, marcadas apenas com o anticorpo secundário anti-IgG humana FITC (controle). J – L: Células da linhagem Hep G2 utilizadas como controle positivo para a expressão de albumina, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC mostrando a expressão de albumina. O núcleo das células foi contra-corado com DAPI, como mostram A, D, G e J. As respectivas sobreposições podem ser vistas em C, F, I e L.



**Figura 14:** Microfotografia de CTM isoladas a partir da retina (RET2) antes e após 21 dias de indução a diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência, aumento de 630X. A – C: Antes da indução à diferenciação, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC, mostrando a expressão de albumina. D – F: Após a indução à diferenciação, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC, mostrando a expressão de albumina. G – I: Antes da indução à diferenciação, marcadas apenas com o anticorpo secundário anti-IgG humana FITC (controle). J – L: Células da linhagem Hep G2 utilizadas como controle positivo para a expressão de albumina, marcadas com o anticorpo primário anti-albumina e secundário anti-IgG humana FITC mostrando a expressão de albumina. O núcleo das células foi contra-corado com DAPI, como mostram A, D, G e J. As respectivas sobreposições podem ser vistas em C, F, I e L.

### *Citoqueratina 18*

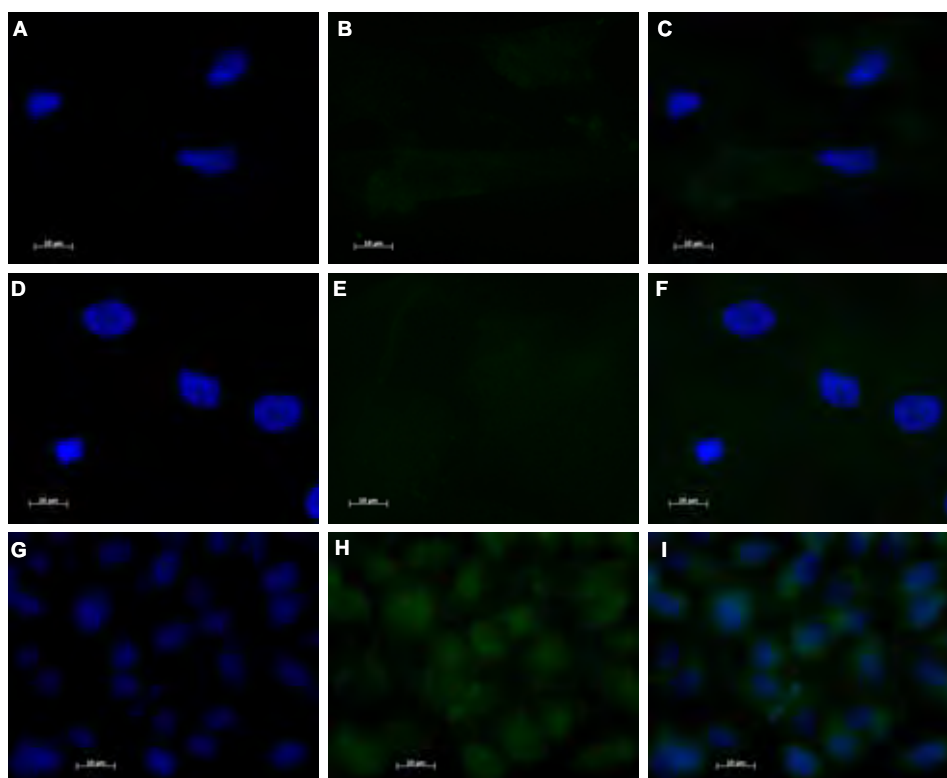
As CTM da medula óssea e da retina, antes e após a indução à diferenciação, não mostraram positividade para a marcação como o anticorpo anti-citoqueratina 18, o que foi visualizado após a segunda marcação como o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com PE. As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo, como mostra a figura 15.



**Figura 15:** Microfotografia de CTM após a indução à diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência aumento de 630X. A – C: CTM da medula óssea após a marcação com o anticorpo primário anti-citoqueratina 18 e secundário anti-IgG humana PE. D – F: CTM da retina após a marcação com o anticorpo primário anti-citoqueratina 18 e secundário anti-IgG humana PE. G – I: Células da linhagem Hep G2 utilizadas como controle positivo, marcadas com o anticorpo primário anti-citoqueratina 18 e secundário anti-IgG humana PE, mostrando a expressão de citoqueratina 18. O núcleo das células foi contra-corado com DAPI, como mostram A, D e G. As respectivas sobreposições podem ser vistas em C, F e I.

### *Alfa-fetoproteína*

As CTM da medula óssea e da retina, antes e após a indução à diferenciação, não mostraram positividade para a marcação como o anticorpo anti- $\alpha$ -fetoproteína, o que foi visualizado após a segunda marcação como o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com FITC. As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo, como mostra a figura 16.



**Figura 16:** Microfotografia de CTM após a indução à diferenciação hepatocítica em microscopia de fluorescência aumento de 630X. A – C: CTM da medula óssea após a marcação com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -fetoproteína e secundário anti-IgG humana FITC. D – F: CTM da retina após a marcação com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -fetoproteína e secundário anti-IgG humana FITC. G – I: Células da linhagem Hep G2 utilizadas como controle positivo, marcadas com o anticorpo primário anti- $\alpha$ -fetoproteína e secundário anti-IgG humana FITC, mostrando a expressão de  $\alpha$ -fetoproteína. O núcleo das células foi contra-corado com DAPI, como mostram A, D e G. As respectivas sobreposições podem ser vistas em C, F e I.

As células analisadas já apresentavam positividade para ALB e negatividade para CK18 e AFP antes de serem induzidas à diferenciação hepatocítica. Após a indução permaneceram com o mesmo perfil de expressão desses marcadores. Os resultados mostram que as CTM analisadas não passaram a produzir 3 dos principais marcadores hepatocíticos



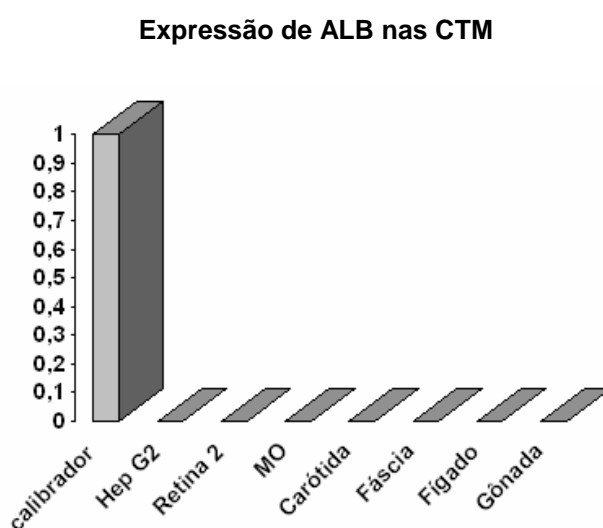
quando induzidas à diferenciação pela metodologia utilizada neste trabalho, o que sugere que elas não se diferenciaram em hepatócitos.

### 4.3 – ANÁLISE DAS CTM PARA A PRODUÇÃO E SECREÇÃO DE ALBUMINA

Os resultados obtidos sugerem que as CTM analisadas podem expressar albumina antes de serem induzidas à diferenciação hepatocítica. Para confirmar esses dados, CTM isoladas de tecidos fetais, da medula óssea e da retina foram analisadas para a produção de transcritos de albumina por RT-PCR em tempo real. Adicionalmente, células da amostra MO14 foram submetidas à marcação com metionina radioativa antes e após 21 dias da indução à diferenciação, para que pudessem secretar proteínas marcadas radioativamente.

#### 4.3.1 – Análise da produção de albumina por RT-PCR em tempo real

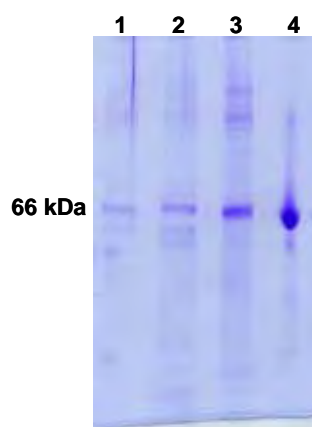
O cDNA das células extraídas do fígado humano foi utilizado como calibrador. Os transcritos de albumina foram detectados em 2 das 3 amostras de células Hep G2. Também foram detectados em todas as amostras de CTM da medula óssea e da retina. Em relação aos tecidos fetais, os transcritos foram detectados em 1 das 3 amostras da carótida, em 2 das 4 amostras de fáschia, em 3 das 5 amostras de fígado e em 1 das 3 amostras de gônada. Na análise comparativa, a expressão de albumina em todas as amostras de CTM foi igual a zero, como mostra a figura 17. Esses resultados sugerem que as CTM isoladas dos diferentes tecidos adultos e fetais analisados expressam níveis muito baixos dos transcritos de albumina.



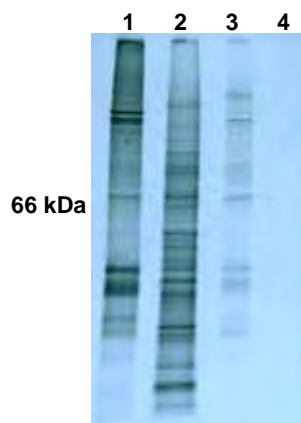
**Figura 17:** Perfil de expressão de albumina nas CTM isoladas de diferentes tecidos, analisadas por RT-PCR em tempo real.

#### 4.3.2 – Análise da secreção de albumina por eletroforese em SDS-PAGE

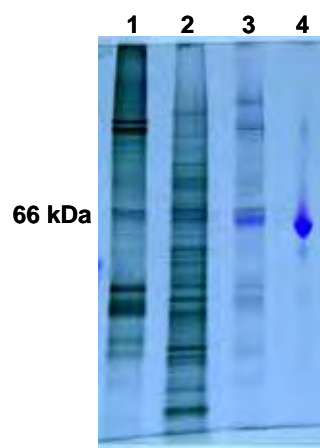
Após a marcação com a metionina radioativa, o sobrenadante contendo todas as proteínas secretadas foi coletado e concentrado. Parte desse sobrenadante foi preparado e aplicado no gel de poliacrilamida 12% (m/v). Após a eletroforese, o gel foi corado para a visualização das bandas referentes às proteínas totais das amostras. A banda esperada de 66 kDa, tamanho referente ao da albumina, foi visualizada nas amostras MO14, Hep G2 e MO14 induzida à diferenciação hepatocítica por 14 dias, como mostra a figura 18. A auto-radiografia do gel foi realizada com exposições durante os tempos: 2 h, 24 h e 72 h. Não houve diferença entre os tempos de exposição. Uma banda com o tamanho aproximado da albumina (66 kDa) foi visualizada nas 3 amostras, como mostra a figura 19. No entanto, a sobreposição do gel com o filme revelou que a banda visualizada no gel, referente ao tamanho exato da albumina, não apareceu na auto-radiografia. A banda que foi visualizada na auto-radiografia está localizada acima da banda da albumina visualizada no gel, como mostra a figura 20. Os resultados indicam que a albumina encontrada no meio de cultivo, visualizada no gel de proteínas totais, não foi produzida pelas CTM pois não estava marcada radioativamente.



**Figura 18:** Perfil eletroforético de proteínas totais em gel de poliacrilamida 12% (m/v) (SDS-PAGE). Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 cultivadas durante 24h em meio sem SFB. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 cultivadas durante 24h em meio sem SFB. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica, cultivadas durante 24h em meio sem SFB. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).



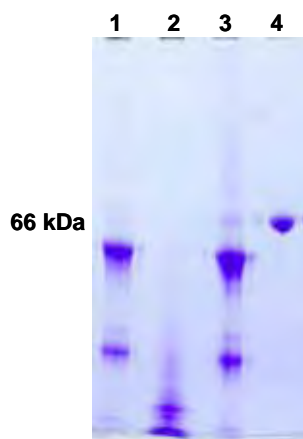
**Figura 19:** Perfil eletroforético de proteínas totais marcadas com metionina radioativa na auto-radiografia. Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 marcadas durante 24h. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 marcadas durante 24h. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica marcadas durante 24h. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).



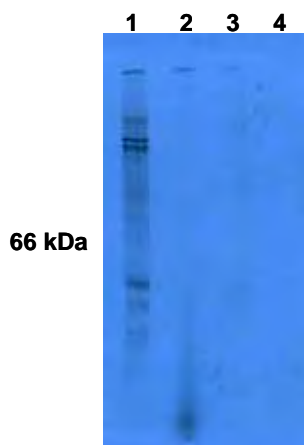
**Figura 20:** Perfil eletroforético de proteínas totais. Sobreposição do gel de agarose 12% (m/v) e do filme da auto-radiografia. Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 marcadas durante 24h. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 marcadas durante 24h. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica marcadas durante 24h. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).

Outra parte do sobrenadante foi submetida a imunoprecipitação com o anticorpo anti-albumina. Após a marcação O.N., as amostras foram lavadas, preparadas e aplicadas no gel de poliacrilamida 12% (m/v). Terminada a eletroforese, o gel foi corado para a visualização da albumina. Apesar da presença de bandas inespecíficas, a banda esperada de 66 kDa não foi visualizada, como mostra a figura 21. A autoradiografia do gel foi posteriormente realizada com exposições durante os tempos: 2 h, 24 h, 72 h e 7 dias e a banda de 66 kDa não foi

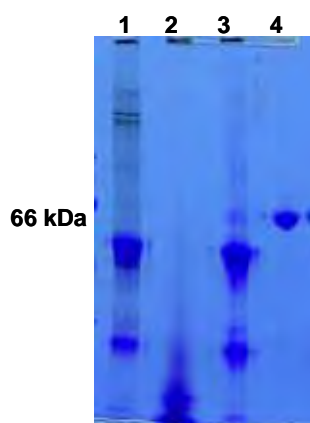
visualizada em nenhuma das amostras, como mostra a figura 22. A figura 23 mostra a sobreposição do gel com o filme revelado. Esses resultados confirmam que a albumina encontrada no meio de cultivo não foi produzida pelas células.



**Figura 21:** Perfil eletroforético do produto da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina em gel de poliacrilamida 12% (m/v) (SDS-PAGE). Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica, marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).



**Figura 22:** Auto-radiografia do perfil eletroforético da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina. Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica, marcadas com metionina radioativa durante 24h. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).



**Figura 23:** Perfil eletroforético do produto da imunoprecipitação de proteínas totais com o anticorpo anti-albumina. Sobreposição do gel de agarose 12% (m/v) e do filme da auto-radiografia. Coluna 1: Sobrenadante de células da amostra MO14 marcadas durante 24h. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 marcadas durante 24h. Coluna 3: Sobrenadante de células da amostra MO14 após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica marcadas durante 24h. Coluna 4: Albumina humana comercial (controle positivo).

#### **4.4 – ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DAS CTM DA MEDULA ÓSSEA PARA O TECIDO HEPÁTICO DANIFICADO DE CAMUNDONGOS NOD-SCID**

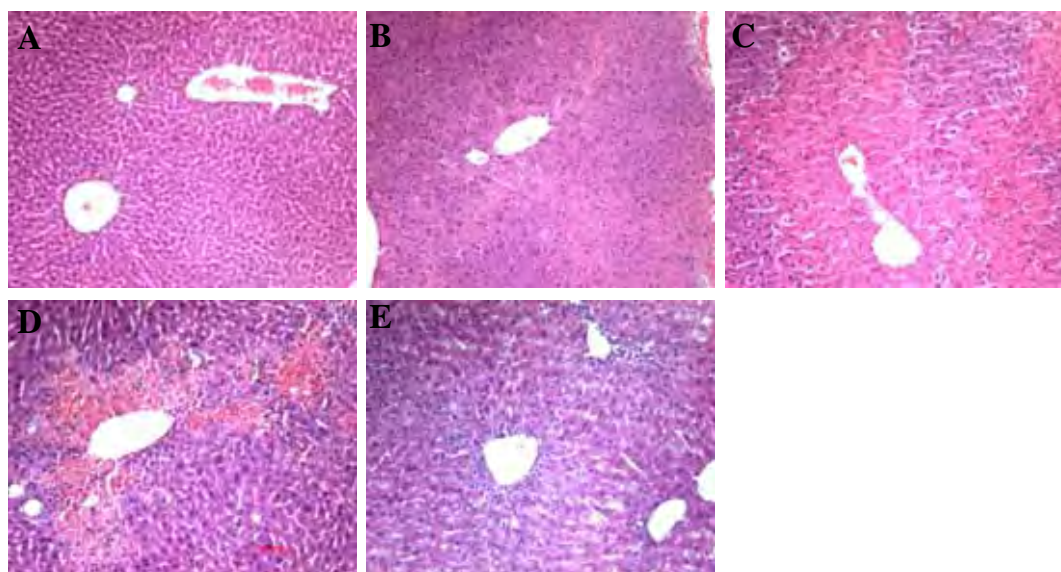
##### **4.4.1 – Estabelecimento do dano hepático induzido pela administração $\text{CCl}_4$ em camundongos da linhagem Balb/C**

Para este experimento foram utilizados 18 animais divididos em 7 grupos. Os animais receberam 0,3 ou 0,5mg/Kg de  $\text{CCl}_4$  diluídos em óleo de milho, via intraperitoneal. Passadas 24, 48 e 96 horas da administração da droga, amostras de sangue foram coletadas para a análise das transaminases hepáticas e os animais foram sacrificados para a análise do tecido hepático. O resultado das análises das transaminases foi similar: passadas 24 horas da administração da droga, os níveis séricos tanto de TGO quanto de TGP dos camundongos induzidos, estavam consideravelmente mais elevados do que os dos camundongos do grupo controle, indicando que o dano foi induzido. Após 48 e 96 horas houve uma queda progressiva dos níveis séricos das transaminases em relação ao grupo controle, como mostra a tabela 7. A análise dos cortes histológicos do tecido hepático mostrou o mesmo padrão de dano apresentado na análise das transaminases hepáticas. Passadas 24 horas da administração do  $\text{CCl}_4$  foi encontrada uma vasta área parenquimal danificada, que também foi vista após 48 horas. Passadas 72 horas, a área danificada foi diminuindo de tamanho, até não ser mais vista no material coletado após 96 horas, como mostra a figura 24. Os resultados da análise das

transaminases hepáticas e da morfologia do tecido hepático após a administração de apenas uma dose de  $\text{CCl}_4$  mostrou que o dano tecidual ocorre de forma aguda, com posterior regeneração ao longo do período. O pico do dano ocorreu entre 24 e 48 horas após a administração da droga. A administração de 0,5mg/Kg de  $\text{CCl}_4$  foi mais eficiente.

**Tabela 7:** Apresentação da média dos níveis séricos de TGO e TGP analisados em diferentes tempos após a administração de 0,3 e 0,5mg/Kg de  $\text{CCl}_4$ .

Grupo	$\text{CCl}_4$	Período em que foi sacrificado	TGO	TGP
<b>G1 controle (n=3)</b>		indiferente	89,9	37,9
<b>G2 (n=2)</b>	0,3 mg/Kg	24h após $\text{CCl}_4$	239,4	118,1
<b>G3 (n=2)</b>	0,3 mg/Kg	49h após $\text{CCl}_4$	121,2	100,5
<b>G4 (n=3)</b>	0,3 mg/Kg	96h após $\text{CCl}_4$	100,0	75,5
<b>G5 (n=3)</b>	0,5 mg/Kg	24h após $\text{CCl}_4$	151,0	128,6
<b>G6 (n=2)</b>	0,5 mg/Kg	48h após $\text{CCl}_4$	153,6	110,8
<b>G7 (n=3)</b>	0,5 mg/Kg	96h após $\text{CCl}_4$	100,3	79,4



**Figura 24:** Microfotografia de cortes histológicos do tecido hepático murino submetido ao dano pela administração de 0,5mg/Kg de  $\text{CCl}_4$ . Coloração HE. A) Controle: fígado não induzido ao dano. B) Após 24h da administração da droga. C) Após 48h da administração da droga. D) Após 72h da administração da droga. E) Após 96h da administração da droga.

#### 4.4.2 – Infusão de CTM em camundongos imunodeficientes induzidos ao dano hepático

Para investigar a capacidade fisiológica dos camundongos NOD-SCID de resistirem à indução ao dano hepático por  $\text{CCl}_4$  e de receberem a infusão de CTM, as concentrações 0,1, 0,2 e 0,4mg/Kg da droga foram testadas. Foram utilizados 12 animais. A infusão de CTM

ocorreu 8 ou 24 horas após a administração da droga. Infusões de PBS 1X foram realizadas nos animais controles, como mostra a tabela 8. Todos os camundongos sobreviveram. Os animais foram sacrificados após 7 dias a partir da infusão das células. Os fígados foram retirados, seccionados em duas partes e congelados. O material foi devidamente identificado e guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 8:** Relação entre a quantidade de  $\text{CCl}_4$  administrada e o período em que os animais receberam as CTM.

<b>Animal</b>	<b><math>\text{CCl}_4</math></b>	<b>Células</b>	<b>PBS 1X</b>
<b>no. 1</b>	0,1mg/Kg	8h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 2</b>	0,1mg/Kg	24h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 3 (controle)</b>	0,1mg/Kg	s/	8h após $\text{CCl}_4$
<b>no. 4 (controle)</b>	0,1mg/Kg	s/	24h após $\text{CCl}_4$
<b>no. 5</b>	0,2mg/Kg	8h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 6</b>	0,2mg/Kg	24h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 7 (controle)</b>	0,2mg/Kg	s/	8h após $\text{CCl}_4$
<b>no. 8 (controle)</b>	0,2mg/Kg	s/	24h após $\text{CCl}_4$
<b>no. 9</b>	0,4mg/Kg	8h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 10</b>	0,4mg/Kg	24h após $\text{CCl}_4$	s/
<b>no. 11 (controle)</b>	0,4mg/Kg	s/	8h após $\text{CCl}_4$
<b>no. 12 (controle)</b>	0,4mg/Kg	s/	24h após $\text{CCl}_4$

#### **4.4.2.1 – Análise da presença de CTM masculinas no tecido hepático dos camundongos fêmeas por Nested-PCR**

Os fígados dos animais no. 1, 2, 5, 6, 9 e 10 foram analisados. A metade de cada fígado foi utilizada para o experimento. Para a obtenção de alto rendimento na extração do DNA total foi utilizado, no máximo, 25mg de tecido por reação. Para tanto, foi necessário seccionar cada amostra em 4 partes. Após a extração, o DNA dos tecidos foi utilizado como molde para a amplificação do fragmento referente ao gene SRY. O produto da reação de Nested-PCR foi aplicado no gel de agarose 1% (m/v) para a eletroforese e visualizado em luz U.V. Todas as amostras foram negativas para a amplificação do fragmento de interesse. Os resultados obtidos sugerem que o dano hepático, da forma como foi induzido, não foi capaz de causar o tropismo das CTM humanas para o fígado dos camundongos.

#### 4.4.3 – Infusão de CTM em camundongos imunodeficientes induzidos ao dano hepático pelo tratamento com CCl<sub>4</sub> durante 4 semanas

Foi pesquisado se o dano hepático causado pelo tratamento dos animais durante 4 semanas com CCl<sub>4</sub> é capaz de causar o tropismo das CTM humanas para o fígado dos camundongos. Foram utilizados 10 animais divididos em 2 grupos. Os dois grupos foram submetidos ao tratamento com 0,5mg/Kg de CCl<sub>4</sub> diluído em óleo de milho, durante 4 semanas, sendo administradas duas doses por semana via intraperitoneal (total de doses administradas = 8), como mostra a tabela 9. Os animais foram sacrificados após 10 dias a partir da infusão das células. Os fígados foram retirados, seccionados em duas partes e congelados. O material foi devidamente identificado e guardado a -80°C.

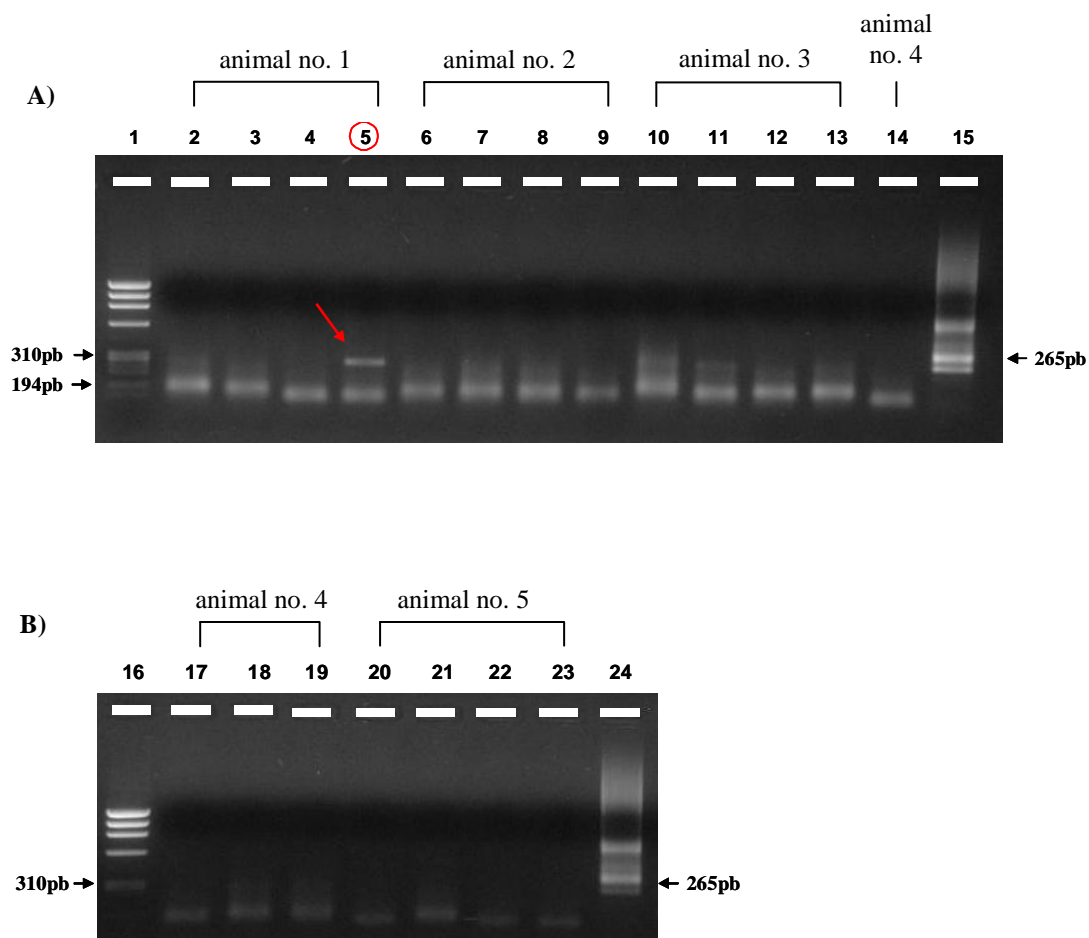
**Tabela 9:** Relação entre os grupos de camundongos e a infusão de CTM ou PBS 1x.

Grupo	CCl <sub>4</sub>	Células	PBS 1X
<b>G1 (n=5)</b>	8 doses (0,5mg/Kg cada) 2X por semana	24h após a última dose da droga	s/
<b>G2 – controle (n=5)</b>	8 doses (0,5mg/Kg cada) 2X por semana	s/	24h após a última dose da droga

##### 4.4.3.1 – Análise da presença de CTM masculinas no tecido hepático dos camundongos fêmeas por Nested-PCR

Os fígados dos animais do grupo 1 foram analisados. A parte do órgão utilizada para a análise foi seccionada em 4 para aumentar o rendimento da extração do DNA total, como no experimento anterior. Após a extração, o DNA dos tecidos foi utilizado como molde para a amplificação. O produto da reação de Nested-PCR foi aplicado no gel de agarose 1% (m/v) para a eletroforese e visualizado em luz U.V. A amplificação do fragmento de 265pb, referente ao gene SRY humano foi observada no fígado do animal no.1, como mostra a figura 25. Os resultados sugerem que as CTM humanas da medula óssea são capazes de migrar para o fígado danificado de camundongos tratados durante 4 semanas com CCl<sub>4</sub>.





**Figura 25:** Análise do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). A) Coluna 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ X. Colunas 2 a 5: Fígado do animal no.1. A seta indica o fragmento de 265pb. Colunas 6 a 9: Fígado do animal no.2. Colunas 10 a 13: Fígado do animal no.3. Coluna 14: Fígado do animal no.4. Coluna 15: Sangue humano masculino (controle positivo). B) Coluna 16: Marcador de peso molecular  $\phi$ X. Colunas 17 a 19: Fígado do animal no.4. Colunas 20 a 23: Fígado do animal no.5. Coluna 24: Sangue humano masculino (controle positivo).

## 5 – DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou o potencial hepatocítico das CTM humanas. As CTM foram inicialmente isoladas da medula óssea e da retina e induzidas à diferenciação hepatocítica *in vitro*. Os métodos utilizados para essa investigação baseiam-se na adição de citocinas e fatores de crescimento ao meio de cultivo. Na hepatogênese, os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) produzidos pelas células do mesoderma cardíaco, estão envolvidos nos estágios iniciais da diferenciação hepatocítica (JUNG e cols., 1999; WELLS e MELTON, 2000). A oncostatina M (OSM), membro da família da interleucina-6, produzida pelas células hematopoéticas, inicia sua participação neste processo do período fetal e se estende até o período neonatal (KAMIYA e cols., 1999) e aparentemente coordena o desenvolvimento hepático e a hematopoese no feto (MIYAJIMA e cols., 2000). Muitos sinais extracelulares incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), a OSM, os FGFs, os glicocorticóides e a insulina estão envolvidos nos estágios tardios de maturação, levando ao aumento na expressão de genes hepáticos específicos (HAMAZAKI e cols., 2001). Os corticoesteróides, o HGF e o EGF têm um importante papel na biologia hepática (MICHALOPOULOS e cols., 2003). O HGF age na proliferação de hepatócitos e possui um papel no desenvolvimento e regeneração hepática em humanos (NISHIZAKI e cols., 1995). Com base nesses conhecimentos foram estabelecidos protocolos que tentaram mimetizar os estímulos ocorridos durante a embriogênese.

Os experimentos de indução à diferenciação hepatocítica utilizados neste trabalho foram montados de acordo com o protocolo anteriormente utilizado por Lee e colaboradores (2004). Os autores, após isolarem as CTM da medula óssea, utilizaram a imuno-seleção negativa e a diluição para o isolamento das colônias. Porém, as diferentes colônias estudadas não apresentaram diferenças no fenótipo e na capacidade de diferenciação. Após a aplicação do protocolo de diferenciação hepatocítica, os autores relataram o desenvolvimento de uma morfologia poligonal ao longo do período, que tornou-se aparente por volta da quarta semana pós-indução. A morfologia cubóide com presença de estruturas granulares, compatível com hepatócitos maduros, foi vista em até 6 semanas de indução. Os marcadores hepatocíticos ALB (imunofluorescência e RT-PCR) e CK18 (RT-PCR) foram detectáveis em todos os tempos ao longo do período de indução, com crescimento gradativo. Os demais marcadores selecionados para a análise foram negativos até a segunda semana, tiveram o aparecimento gradativo até a quarta semana e tornaram-se fortemente positivos nas células induzidas por volta da sexta semana. De maneira similar, no presente trabalho nós observamos a morfologia

poligonal e a presença de estruturas granulares por volta da quarta semana após a indução. Porém, as células induzidas à diferenciação hepatocítica, apesar de terem adquirido uma morfologia semelhante à do hepatócito, não apresentaram modificações no seu perfil imunofenotípico. Após 14, 21 e 28 de indução, as células permaneceram com altos níveis de expressão para os marcadores de CTM. Assim como no trabalho de Lee e colaboradores, níveis basais dos principais marcadores hepatocíticos (ALB, CK18 e CK19) foram detectados pela técnica de RT-PCR em tempo real nas células não induzidas. Porém, as células induzidas durante 2, 7, 14, 21 e 28 dias não aumentaram os níveis de expressão desses transcritos. Esses resultados foram condizentes com os observados pela técnica de imunofluorescência; as células induzidas durante 14, 21 e 28 dias não apresentaram diferenças na produção dos marcadores ALB, CK18 e AFP, em relação às não induzidas. A fraca positividade para o anticorpo anti-ALB apresentada pelas células antes e após a indução foi investigada pela marcação das mesmas com aminoácido radioativo e posterior eletroforese de proteínas. Apesar de uma banda do tamanho aproximado da albumina (66 kDa) ter sido visualizada no gel, a auto-radiografia revelou que as células não induzidas e induzidas não produzem albumina. A albumina detectada na imunofluorescência e no gel de proteínas pode ser um contaminante do meio utilizado inicialmente para a expansão das CTM, que ainda apresentava soro fetal bovino em sua composição.

Após 28 dias de cultivo, um grande número de células entrou em apoptose e se despreendeu da placa, inviabilizando a investigação mais tardia. Taléns-Visconti e colaboradores (2006) também utilizaram esse mesmo protocolo de indução à diferenciação hepatocítica e analisaram as células induzidas por até 21 dias. Os autores fizeram a comparação entre CTM isoladas da medula óssea e do tecido adiposo. Ambas as células foram isoladas por gradiente de densidade e aderência ao plástico, e cultivadas em meio contendo soro fetal bovino, como realizado neste trabalho. O protocolo de indução foi aplicado assim que as células atingiram 85% de confluência. As modificações morfológicas foram condizentes com as observadas em nosso trabalho, após 21 dias as células apresentaram uma morfologia semelhante a do hepatócito. As análises foram feitas em 7, 14 e 21 dias pós-indução e os resultados revelaram um aumento na produção dos transcritos de albumina, HNF4 $\alpha$  e C/EBP $\beta$ , a diminuição do marcador de superfície celular CD90 ao longo do período de indução hepatocítica, especialmente nas CTM do tecido adiposo, e a produção de ALB e AFP por imunofluorescência. Contudo, não foi detectado o aumento dos transcritos de CK18 e CK19, dois importantes marcadores de hepatócitos. Os autores concluem que os resultados

alcançados não são suficientes para afirmar que CTM da medula ou do tecido adiposo são, de fato, potentes células progenitoras hepáticas.

Seo e colaboradores (2005) utilizando em CTM do tecido adiposo uma metodologia simplificada de indução a diferenciação hepatocítica, baseada no cultivo das células com meio sem SFB acrescido de DMSO, HGF e OSM, relataram o aumento na expressão dos marcadores ALB e AFP. Porém, os autores também não observaram o aumento na expressão dos marcadores CK18 e CK19, indicando que as células não se diferenciaram em hepatócitos.

Recentemente, Lysy e colaboradores (2008) utilizando um protocolo de diferenciação hepatocítica *in vitro* semelhante ao utilizado em nosso estudo relatou que CTM da medula óssea adquirem alguns dos principais marcadores hepatocíticos após a indução e permanecem com os marcadores imunofenotípicos de CTM (co-expressão de ALB, CD73 e CD90). Os resultados dos experimentos realizados *in vivo* corroboraram com os encontrados *in vitro*, o que indica que as células geradas a partir da indução de CTM à diferenciação hepatocítica não são hepatócitos.

Por outro lado, a aquisição de alguns marcadores hepatocíticos específicos pelo cultivo *in vitro* com fatores de crescimento e citocinas levam a comunidade científica a classificar tipos celulares originados a partir de células-tronco como hepatócitos. A aplicação do termo hepatócitos para tais células pode não estar correta. A elucidação de alguns mecanismos como a perda da expressão de alguns fatores de transcrição ou a modificação de transdutores de sinais deve ser priorizada. A modificação da morfologia ou a aquisição de alguns marcadores hepatocíticos não devem ser suficientes para categorizarmos os tipos celulares gerados a partir das CTM como hepatócitos.

O comportamento das CTM da medula óssea frente ao dano hepático *in vivo* também foi investigado neste trabalho. Experimentos para a caracterização do dano hepático foram realizados e a droga hepatotóxica CCl<sub>4</sub> foi selecionada para causar injúria centro-lobular. Os resultados do primeiro experimento, realizado com camundongos Balb/C, mostraram que a administração de uma dose (0,5mg/Kg) da droga aumenta os níveis das transaminases hepáticas causando o dano tecidual reversível, como também visualizado nos cortes histológicos por meio da coloração H.E. Os resultados do segundo experimento, realizado com camundongos imunodeficientes da linhagem NOD SCID, mostraram que esses animais, apesar de serem fisicamente menores e mais frágeis, suportam o dano hepático induzido e a infusão das CTM pois não foram levados a óbito. Porém, a análise dos fígados dos camundongos NOD SCID para a presença do gene SRY humano, realizada após 7 dias da infusão das CTM humanas, mostrou no terceiro experimento que o dano hepático causado não

foi eficiente no recrutamento das CTM humanas para o fígado danificado. A estratégia de indução do dano hepático foi modificada. Os camundongos NOD SCID foram tratados com a droga durante 4 semanas para intensificar o dano. As CTM humanas foram infundidas e após 10 dias os fígados foram analisados. Os resultados do quarto experimento mostraram a presença das células humanas em 1 dos 5 animais utilizados no experimento.

O potencial migratório das CTM da medula óssea para o tecido hepático danificado sugere que estas células possuem um papel na regeneração hepática. Porém, os resultados obtidos *in vitro* nos impele a olhar para o efeito parácrino que as CTM exercem sobre os órgãos e tecidos. Russo e colaboradores (2006) realizaram o transplante da medula óssea de camundongos machos em fêmeas irradiadas e, após a confirmação da repopulação da medula óssea, induziu os receptores ao dano hepático. Células dos animais doadores foram localizadas no fígado dos receptores. Os resultados adquiridos sugerem o recrutamento e a contribuição das células da medula óssea, predominantemente das CTM, durante o dano crônico do fígado. Porém, essas células não mostraram indícios de diferenciação em hepatócitos ou de repopulação do parênquima hepáticos.

Sabemos que as células estreladas, além de serem ativadas durante a injúria tecidual diferenciando-se em miofibroblastos, também contribuem para o reparo do tecido secretando fatores de crescimento que irão agir na proliferação dos hepatócitos (SCHMIDT e cols., 1995; SKRTIC e cols., 1999). Da mesma forma, as CTM exercem um efeito imunomodulatório sobre tecidos e órgãos danificados, o que é inclusive uma das teorias mais aceitas pelos pesquisadores para explicar o papel das mesmas na reconstituição ou melhora dos tecidos. A hipótese de que as CTM da medula óssea são células equivalentes às células estreladas no fígado corrobora com a literatura recente (COVAS e cols., 2008) e também explicaria os resultados obtidos.

Paralelamente, foi pesquisado se as CTM isoladas de diferentes tecidos expressam albumina antes de serem induzidas à diferenciação hepatocítica. As CTM humanas foram isoladas de tecidos fetais; 3 carótidas, 3 fâscias, 5 fígados e 3 gônadas. O isolamento e a caracterização das células foram realizados de maneira similar aos dos tecidos adultos. O RNA das CTM dos tecidos adultos e fetais foi extraído e transcrito em cDNA. A expressão dos transcritos de ALB foi detectada pela técnica de RT-PCR em tempo real em todas as amostras dos tecidos adultos e na maioria das amostras dos tecidos fetais. Porém, a análise comparativa dos resultados mostrou que, em relação a amostra calibradora (cDNA de células extraídas do fígado humano), a expressão de ALB nas CTM analisadas é igual a zero. Células da linhagem Hep G2 também foram analisadas e mostraram baixa expressão de ALB.

No presente trabalho, a metodologia utilizada para a indução da diferenciação hepatocítica *in vitro* a partir das CTM da medula óssea, apesar de induzir as células à aquisição de uma morfologia semelhante à do hepatócito, não foi eficaz para induzir a aquisição de importantes marcadores hepatocíticos. Entre as 4 amostras testadas, apenas uma mostrou o aumento da expressão dos transcritos de albumina e ainda assim, não mostrou o aumento dos níveis de expressão da proteína, como visualizado por imunofluorescência e *western blotting*. As CTM da medula óssea mostraram potencial migratório para o tecido hepático danificado quando investigadas *in vivo*, o que sugere que estas células podem participar no processo de restauração do fígado.

## 6 – CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível isolar e caracterizar as CTM da medula óssea e da retina humanas.
- ✓ As CTM isoladas, quando induzidas à diferenciação hepatocítica *in vitro* pelo protocolo utilizado neste trabalho, adquiriram a morfologia semelhante à do hepatócito mas não aumentaram os níveis de expressão dos transcritos de albumina, citoqueratina 18 e citoqueratina 19, e não passaram a produzir albumina, citoqueratina 18 e alfa-fetoproteína, o que indica que elas não foram capazes de se diferenciar em hepatócitos *in vitro*.
- ✓ As CTM isoladas e as CTM dos tecidos fetais utilizadas neste trabalho expressam níveis baixos dos transcritos de albumina. As células não secretam albumina no meio de cultivo.
- ✓ Foi possível estabelecer o dano hepático em camundongos pela administração de CCl<sub>4</sub>. A administração de uma única dose (0,5 mg/Kg) da droga produz dano hepático reversível. Esse dano não foi eficaz para causar o tropismo das CTM para o fígado.
- ✓ O dano hepático causado pela administração de 8 doses (0,5mg/Kg) de CCl<sub>4</sub> foi capaz de proporcionar o tropismo das CTM para o fígado.
- ✓ As CTM isoladas a partir da medula óssea são capazes de migrar para o tecido hepático danificado de camundongos imunodeficientes quando infundidas na circulação dos animais, indicando o seu papel do reparo do tecido.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISI A., LEONI S., PIACENTANI A., CONTI DEVIRGILIS L. Retinoic acid modulates the cell-cycle in fetal rat hepatocytes and HepG2 cells by regulating cyclin-cdk activities. **Liver Int.**, v. 23, n. 3, p. 179-186, Jun. 2003.

ALISON M. R., VIG P., RUSSO F., BIGGER B. W., AMOFAH E., THEMIS M., FORBES S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? **Cell Prolif.**, v. 37, n. 1, p. 1-21, Feb. 2004.

ALVAREZ-DOLADO M., PARDAL R., GARCIA-VERDUGO J. M., FIKE J. R., LEE H. O., PFEFFER K., LOIS C., MORRISON S. J., ALVAREZ-BUYLLA A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature.**, v. 425, n. 6961, p. 968-973, Oct. 2003.

ANILKUMAR T. V., GOLDING M., EDWARDS R. J., LALANI E. N., SARRAF C. E., ALISON M. R. The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat: the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. **Carcinogenesis.**, v. 16, n.4. p. 845-853, Apr. 1995.

BARRY F., BOYNTON R. E., LIU B., MURPHY J. M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Exp Cell Res.**, v. 268, n. 2, p. 189-200, Aug. 2001.

BARRY F., BOYNTON R., MURPHY M., HAYNESWORTH S., ZAIA J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 289, n. 2, p. 519-524, Nov. 2001. Errata em: **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 290, n. 5, p. 1609, Feb. 2002.

BÖYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.**, v. 97, p. 77-79, 1968.



BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May. 1976.

BROOLING J. T., CAMPBELL J. S., MITCHELL C., YEOH G. C., FAUSTO N. Differential regulation of rodent hepatocyte and oval cell proliferation by interferon gamma. **Hepatology.**, v. 41, n. 4, p. 906-915, Apr. 2005.

BRUCCOLERI A., GALLUCCI R., GERMOLEC D. R., BLACKSHEAR P., SIMEONOVA P., THURMAN R. G., LUSTER M. I. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. **Hepatology.**, v. 25, n. 1, p. 133-141, Jan. 1997.

BRUDER S. P., RICALTON N. S., BOYNTON R. E., CONNOLLY T. J., JAISWAL N., ZAIA J., BARRY F. P. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. **Bone Miner Res.**, v. 13, n. 4, p. 655-663, Apr. 1998.

BÜHRING H. J., BATTULA V. L., TREML S., SCHEWE B., KANZ L., VOGEL W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1106, p. 262-271, Jun. 2007.

CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-159, Apr. 1987.

CONLEY B. J., YOUNG J. C., TROUNSON A. O., MOLLARD R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 36, n. 4, p. 555-567, Apr. 2004.

COVAS D. T. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146b perivascular cells and fibroblasts. **Exp Hematol.**, 2008. Aceito para publicação.

COVAS D. T., PICCINATO C. E., ORELLANA M. D., SIUFI J. L., SILVA W. A. JR, PROTO-SIQUEIRA R., RIZZATTI E. G., NEDER L., SILVA A. R., ROCHA V., ZAGO M. A. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Exp Cell Res.**, v. 309, n. 2, p. 340-344, Oct. 2005.

COVAS D. T., SIUFI J. L., SILVA A. R., ORELLANA M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, Sep. 2003.

CZYZ J., WIESE C., ROLLETSCHEK A., BLYSZCZUK P., CROSS M., WOBUS A. M. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. **Biol Chem.**, v. 384, n. 10-11, p. 1391-1409, Oct. 2003.

DE BARI C., DELL'ACCIO F., TYLZANOWSKI P., LUYTEN F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, Aug. 2001.

EDWARDS M. J., KELLER B. J., KAUFFMAN F. C., THURMAN R. G. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 119, n. 2, p. 275-279, Apr. 1993.

ERICES A., CONGET P., MINGUELL J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol.**, v. 109, n. 1, p. 235-242, Apr. 2000.

EVARTS R. P., NAGY P., NAKATSUKASA H., MARSDEN E., THORGEIRSSON S. S. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. **Cancer Res.**, v. 49, n. 6, p. 1541-1547, Mar. 1989.

FANG L., LANGE C., ENGEL M., ZANDER A. R., FEHSE B. Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. **Transplantation.**, v. 82, n. 10, p. 1370-1373, Nov. 2006.

FARBER J. L., EL-MOFTY S. K. The biochemical pathology of liver cell necrosis. **Am J Pathol.**, v. 81, n. 1, p. 237-250, Oct. 1975.

FAUSTO N., LEMIRE J. M., SHIOJIRI N. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 204, n. 3, p. 237-241, Dec. 1993.

FIEGEL H. C., LIOZNOV M. V., CORTES-DERICKS L., LANGE C., KLUTH D., FEHSE B., ZANDER A. R. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. **Stem Cells**, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2003.

FOTIADU A., TZIOUFA V., VRETTOU E., KOUFOGIANNIS D., PAPADIMITRIOU C. S., HYTIROGLOU P. Progenitor cell activation in chronic viral hepatitis. **Liver Int.**, v. 24, n. 3, p. 268-274, Jun. 2004.

FRIEDENSTEIN A. J., GORSKAJA J. F., KULAGINA N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol.**, v. 4, n. 5, p. 267-274, Sep 1976.

FRIEDENSTEIN A. J., PIATETZKY-SHAPIRO II, PETRAKOVA K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morphol.**, v. 16, n 3, p. 381-390, Dec. 1966.

GOLDING M., SARRAF C. E., LALANI E. N., ANILKUMAR T. V., EDWARDS R. J., NAGY P., THORGEIRSSON S. S., ALISON M. R. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. **Hepatology**, v. 22, n. (4 Pt 1), p. 1243-1253, Oct. 1995.

GROMPE M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. **Semin Liver Dis.**, v. 23, n. 4, p. 363-372, Nov. 2003.

GRONTHOS S., FRANKLIN D. M., LEDDY H. A., ROBEY P. G., STORMS R. W., GIMBLE J. M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **J Cell Physiol.**, v. 189, n. 1, p. 54-63, Oct. 2001.

GUETTIER C. Which stem cells for adult liver? **Ann Pathol.**, v. 25, n. 1, p. 33-44, Feb. 2005.

HAMAZAKI T., IIBOSHI Y., OKA M., PAPST P. J., MEACHAM A. M., ZON L. I., TERADA N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. **FEBS Lett.**, v. 497, n. 1, p. 15-19, May 2001.

HARRIS R. G., HERZOG E. L., BRUSCIA E. M., GROVE J. E., VAN ARNAM J. S., KRAUSE D. S. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. **Science.**, v. 305, n. 5680, p. 90-93, Jul. 2004.

HESELTON R. M., GREINER D. L., MORDES J. P., RAJAN T. V., SULLIVAN J. L., SHULTZ L. D. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. **J Infect Dis.**, v. 172, n. 4, p. 974-982, Oct. 1995.

IGURA K., ZHANG X., TAKAHASHI K., MITSURU A., YAMAGUCHI S., TAKASHI T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy.**, v. 6, n. 6, p. 543-553, 2004.

JANKOWSKI R. J., DEASY B. M., HUARD J. Muscle-derived stem cells. **Gene Ther.**, v. 9, n. 10, p. 642-647, May 2002.

JOHANSSON A. C., LINDQVIST A. K., JOHANNESSON M., HOLMDAHL R. Genetic heterogeneity of autoimmune disorders in the nonobese diabetic mouse. **Scand J Immunol.**, v. 57, n. 3, p. 203-213, Mar. 2003.

JUNG J., ZHENG M., GOLDFARB M., ZARET K. S. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. **Science**, v. 284. n. 5422, p. 1998-2003, Jun. 1999.

KAKINUMA S., TANAKA Y., CHINZEI R., WATANABE M., SHIMIZU-SAITO K., HARA Y., TERAMOTO K., ARII S., SATO C., TAKASE K., YASUMIZU T., TERAOKA H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. **Stem Cells**, v. 21, n. 2, p. 217-227, 2003.

KAMIYA A., KINOSHITA T., ITO Y., MATSUI T., MORIKAWA Y., SENBA E., NAKASHIMA K., TAGA T., YOSHIDA K., KISHIMOTO T., MIYAJIMA A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. **EMBO J.**, v. 18, n. 8, p. 2127-2136, Apr. 1999.

KNOWLES B. B., HOWE C. C., ADEN D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, **Science**, v. 209, p. 497-499, 1980.

KOBAYASHI N., OKITSU T., NAKAJI S., TANAKA N. Hybrid bioartificial liver: establishing a reversibly immortalized human hepatocyte line and developing a bioartificial liver for practical use. **J Artif Organs.**, v. 6, n. 4, p. 236-244, 2003.

LÁZARO C. A., CROAGER E. J., MITCHELL C., CAMPBELL J. S., YU C., FORAKER J., RHIM J. A., YEOH G. C., FAUSTO N. Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1095-1106, Nov. 2003.

LEBLOND V., AUTRAN B., CESBRON J. Y. The SCID mouse mutant: definition and potential use as a model for immune and hematological disorders. **Hematol Cell Ther.**, v. 39, n. 5, p. 213-221, Oct. 1997.

LEE H. T., LEE J. G., NA M., KAY E. P. FGF-2 induced by interleukin-1 beta through the action of phosphatidylinositol 3-kinase mediates endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 31, p. 32325-32332, Jul. 2004

LEE K. D., KUO T. K., WHANG-PENG J., CHUNG Y. F., LIN C. T., CHOU S. H., CHEN J. R., CHEN Y. P., LEE O. K. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Hepatology.**, v. 40, n. 6, p. 1275-1284, Dec. 2004.

LYSY P. A., CAMPARD D., SMETS F., MALAISE J., MOURAD M., NAJIMI M., SOKAL E. M. Persistence of a chimerical phenotype after hepatocyte differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Prolif.**, v. 41, n. 1, p. 36-58, Feb. 2008.

MATSUSAKA S., TOYOSAKA A., NAKASHO K., TSUJIMURA T., SUGIHARA A., TAKANASHI T., UEMATSU K., TERADA N., OKAMOTO E. The role of oval cells in rat hepatocyte transplantation. **Transplantation.**, v. 70, n. 3, p. 441-446, Aug. 2000.

MICHALOPOULOS G. K., BOWEN W. C., MULÈ K., LUO J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. **Gene Expr.**, v. 11, n. 2, p. 55-75, 2003.

MIURA M., GRONTHOS S., ZHAO M., LU B., FISHER L. W., ROBEY P. G., SHI S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, May. 2003.

MIYAJIMA A., KINOSHITA T., TANAKA M., KAMIYA. A., MUKOUYAMA Y., HARA T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 11, n. 3, p. 177-183, Sep. 2000.

NISHIZAKI T., TAKENAKA K., YOSHIKUNI T., YANAGA K., SOEJIMA Y., SHIRABE K., SUGIMACHI K. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. **J Am Coll Surg.**, v. 181, n. 1, p. 6-10, Jul. 1995.

NOORT W. A., KRUISSELBRINK A. B., INT ANKER P. S., KRUGER M. , VAN BEZOOIJEN R. L., DE PAUS R. A., HEEMSKERK M. H., LÖWIK C. W., FALKENBURG J. H., WILLEMZE R. , FIBBE W. E. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. **Exp Hematol.**, v. 30, n. 8, p. 870-878, Aug. 2002.

OH S. H., MIYAZAKI M., KOUCHI H., INOUE Y., SAKAGUCHI M., TSUJI T., SHIMAN., HIGASHIO K., NAMBA M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 279, n. 2, p. 500-504, Dec. 2000.

PAREKKADAN B, VAN POLL D, SUGANUMA K, CARTER EA, BERTHIAUME F, TILLES AW, YARMUSH ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. e941, Sep. 2007.

PAREKKADAN B., VAN POLL D., MEGEED Z., KOBAYASHI N., TILLES A. W., BERTHIAUME F., YARMUSH M. L. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 363, n. 2, p. 247-252, Nov. 2007.

PETERSEN B. E., BOWEN W. C., PATRENE K. D., MARS W. M., SULLIVAN A. K., MURASE N., BOGGS S. S., GREENBERGER J. S., GOFF J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1168-1170, May. 1999.

PETERSEN B. E., GROSSBARD B., HATCH H., PI L., DENG J., SCOTT E. W. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. **Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 632-640, Mar. 2003.

PETERSEN B. E., ZAJAC V. F., MICHALOPOULOS G. K. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. **Hepatology**, v. 27, n. 4, p. 1030-1038, Apr. 1998.

REITMAN S, FRANKEL S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **Am J Clin Pathol.**, v. 28, n. 1. p. 56-63, Jul. 1957.

RUSSO F. P., ALISON M. R., BIGGER B. W., AMOFAH E., FLOROU A., AMIN F., BOUGHARIOS G., JEFFERY R., IREDALE J. P., FORBES S. J. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 6, p. 1807-1821, May. 2006.

RUSSO F. P., KALLIS Y. N., ALISON M. R., FORBES S. J. Bone marrow cells in the liver: diverse cells, diverse effects. **Hepatology**, v. 46, n. 2, p. 604-605, Aug. 2007.

SATO F., MITAKA T., MIZUGUCHI T., MOCHIZUKI Y., HIRATA K. Effects of nicotinamide-related agents on the growth of primary rat hepatocytes and formation of small hepatocyte colonies. **Liver**, v. 19, n. 6, p. 481-488, Dec. 1999.

SCHMELZER E., WAUTHIER E., REID L. M. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. **Stem Cells.**, v. 24, n. 8, p. 1852-1858, Aug. 2006.

SCHMIDT C., BLADT F., GOEDECKE S., BRINKMANN V., ZSCHIESCHE W., SHARPE M., GHERARDI E., BIRCHMEIER C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. **Nature**, v. 373, n. 6516, p. 699-702, 1995.

SEO M. J., SUH S. Y., BAE Y. C., JUNG J. S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 328, n. 1, p. 258-264, Mar. 2005.

SIMMONS P. J, TOROK-STORB B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. **Blood**, v. 78, n. 1, p. 55-62, Jul. 1991.

SINCLAIR A. H., BERTA P., PALMER M. S., HAWKINS J. R., GRIFFITHS B. L., SMITH M. J., FOSTER J. W., FRISCHAUF A. M., LOVELL-BADGE R., GOODFELLOW P. N. A



gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature.**, v. 346, n. 6281, p. 240-244, Jul. 1990.

SKRTIC S., WALLENIOUS V., EKBERG S., BRENZEL A., GRESSNER A. M., JANSSON J. O. Hepatocyte-stimulated expression of hepatocyte growth factor (HGF) in cultured rat hepatic stellate cells. **J Hepatol.**, v. 30, n. 1, p. 115-124, Jan. 1999.

TALÉNS-VISCONTI R., BONORA A., JOVER R., MIRABET V., CARBONELL F., CASTELL J. V., GÓMEZ-LECHÓN M. J. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **World J Gastroenterol.**, v. 12, n. 36, p. 5834-5845, Sep. 2006.

THEISE N. D., BADVE S., SAXENA R., HENEGARIU O., SELL S., CRAWFORD J. M., KRAUSE D. S. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. **Hepatology**, v. 31, n. 1, p. 235-240, Jan. 2000.

THEISE N. D., NIMMAKAYALU M., GARDNER R., ILLEI P. B., MORGAN G., TEPERMAN L., HENEGARIU O., KRAUSE D. S. Liver from bone marrow in humans. **Hepatology**, v. 32, n. 1, p. 11-16, Jul. 2000.

TILL J. E., MCCULLOCH E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res.**, v. 14, p. 213-222, Feb. 1961.

VASSILOPOULOS G., WANG P. R., RUSSELL D. W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 901-904, Apr. 2003.

WANG X., GE S., MCNAMARA G., HAO Q. L., CROOKS G. M., NOLTA J. Á. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4201-4208, May. 2003.

WELLS JM, MELTON DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. **Development.**, v. 127, n. 8, p. 1563-1572, Apr. 2000.

XIAO J. C., RUCK P., ADAM A., WANG T. X., KAISERLING E. Small epithelial cells in human liver cirrhosis exhibit features of hepatic stem-like cells: immunohistochemical, electron microscopic and immunoelectron microscopic findings. **Histopathology**, v. 42, n. 2, p. 141-149, Feb. 2003.

ZVAIFLER N. J., MARINOVA-MUTAFCHIEVA L., ADAMS G., EDWARDS C. J., MOSS J., BURGER J. A., MAINI R. N. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis Res.**, v. 2, n. 6, p. 477-488, 2000.

**Diferenciação hepatocítica de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana**

**Hepatocytic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells**

Flora Cristina Lobo Penteadó<sup>1,2</sup>, Maristela Delgado Orellana<sup>2</sup>, Aparecida Maria Fontes<sup>2</sup>,  
Simone Kashima<sup>2</sup>, Dimas Tadeu Covas<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP.

<sup>2</sup>Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP.

Autor correspondente:

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Rua Tenente Catão Roxo 2501

cep.: 140520140 – Ribeirão Preto-SP – Brasil

Telefone.: (16) 2101-9300 - Fax: (16) 2101-9309

e-mail: [dimas@hemocentro.fmrp.usp.br](mailto:dimas@hemocentro.fmrp.usp.br)

Título resumido: Diferenciação hepatocítica de CTM

**RESUMO**

Alguns trabalhos realizados recentemente relatam que as células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser induzidas à aquisição de marcadores hepatocíticos pelo transplante em modelos animais de dano hepático, ou pelo cultivo *in vitro* com fatores de crescimento e citocinas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento das CTM frente à indução da diferenciação hepatocítica. As CTM foram isoladas da medula óssea de quatro doadores saudáveis, caracterizadas e submetidas ao protocolo de indução à diferenciação hepatocítica *in vitro* e *in vivo*. As células induzidas *in vitro* apresentaram mudanças na sua morfologia, mostrando a morfologia semelhante à do hepatócito, porém, o perfil imunofenotípico não foi modificado. As células induzidas também não apresentaram o aumento dos transcritos de albumina, citoqueratina 18 e citoqueratina 19 quando analisadas por RT-PCR em tempo real, e não alteraram a expressão de albumina, citoqueratina 18 e alfa-fetoproteína como demonstrado por imunofluorescência. Quando analisadas *in vivo*, as CTM demonstraram o potencial migratório para o tecido hepático danificado de camundongos imunodeficientes. Em conjunto, os resultados sugerem que as CTM da medula óssea não são capazes de se diferenciar em hepatócitos quando estimuladas *in vitro* pela metodologia utilizado neste trabalho, mas são capazes de migrar para o tecido hepático danificado *in vivo*, o que sugere o seu papel no reparo do fígado. A contribuição para o reparo pode estar associada com o efeito parácrino dessas células.

Palavras-chave: célula-tronco mesenquimal, diferenciação hepatocítica, albumina, citoqueratina 18, dano hepático, camundongos imunodeficientes.

## ***ABSTRACT***

Some recently works have been reported that mesenchymal stem cells (MSC) can be induced to the acquisition of hepatocytic markers for the transplant in animal models of liver damage, or for the in vitro culture with growth factors and cytokines. The present work aim is to evaluate the behavior of the MSC in front of the induction of the hepatocytic differentiation. The MSC was isolated from the bone marrow of 4 normal donators, characterized and submitted to the protocol of in vitro and in vivo induction of hepatocytic differentiation. The in vitro induced cells showed morphology changes acquiring hepatocytes-like morphology. However, the immunophenotypic profile of those cells was not modified. The induced cells did not present increase of the albumin, cytokeratin 18 and cytokeratin 19 transcripts, when analyzed by real time RT-PCR. The expression of albumin, cytokeratin 18 and alpha foetoprotein was also not modified as demonstrated by immunofluorescence. In vivo, the MSC have demonstrated the migratory potential for the damaged liver of immunodeficient mice. Together, the results suggest that the bone marrow MSC are not capable of in vitro hepatocytic differentiating according to the approach in this work, but are capable to homming into damaged hepatic tissue in vivo. This migration capacity suggests their role in the repair mechanisms. The contribution for the damage repair could be associated with the paracrine effect of these cells.

Key words: mesenchymal stem cells, hepatocytic differentiation, albumin, cytokeratin 18, liver damage, immunodeficient mice.

## **INTRODUÇÃO**

O primeiro trabalho sugerindo o papel de células-tronco extra-hepáticas no reparo do fígado foi publicado em 1999 (Petersen et al., 1999). Os autores utilizaram 2-acetilaminofluoreno para bloquear a proliferação dos hepatócitos nos ratos e induzir a proliferação de células ovas. Fêmeas murinas previamente irradiadas receberam células da medula óssea de machos não tratados. Quando analisados, os fígados dos animais transplantados apresentaram células marcadas positivamente para o cromossomo Y, sugerindo existência de uma população de células-troco na medula óssea capaz de migrar para o tecido hepático danificado e auxiliar no seu reparo. Desde então, muitos trabalhos foram realizados para investigar o potencial das células-tronco da medula óssea na restauração do fígado. A capacidade de que essas células têm de restaurar o tecido hepático não foi esclarecida. Algumas teorias foram postuladas para tentar explicar esse fenômeno e as mais discutidas são: a transdiferenciação (Theise et al., 2000a; Theise et al., 2000b, Harris et al., 2004), a fusão (Wang et al., 2003, Vassipoulos et al., 2003; Alvarez-Dolado et al., 2003) e, mais recentemente, o efeito parácrino que as células-tronco mesenquimais exercem (Parekkadan et al., 2007a; Parekkadan et al., 2007b).

Os métodos utilizados para investigar o potencial hepatocítico das células-tronco mesenquimais (CTM) *in vitro* baseiam-se na adição de citocinas e fatores de crescimento ao meio de cultivo. Na hepatogênese, os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) produzidos pelas células do mesoderma cardíaco, estão envolvidos nos estágios iniciais da diferenciação hepatocítica (Jung et al., 1999; Wells & Melton, 2000). A oncostatina M (OSM), membro da família da interleucina-6, produzida pelas células hematopoéticas, inicia sua participação neste processo do período fetal e se

estende até o período neonatal (Kamiya et al., 1999) e aparentemente coordena o desenvolvimento hepático e a hematopoese no feto (Miyajima et al., 2000). Muitos sinais extracelulares incluindo o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), a OSM, os FGFs, os glicocorticóides e a insulina estão envolvidos nos estágios tardios de maturação, levando ao aumento na expressão de genes hepáticos específicos (Hamazaki et al., 2001). Os corticoesteróides, o HGF e o EGF têm um importante papel na biologia hepática (Michalopoulos et al., 2003). O HGF age na proliferação de hepatócitos e possui um papel no desenvolvimento e regeneração hepática em humanos (Nishizaki et al., 1995). Com base nesses conhecimentos foram estabelecidos protocolos que tentaram mimetizar os estímulos ocorridos durante a embriogênese.

Muitos estudos *in vitro* foram realizados para tentar esclarecer a questão da diferenciação das células-tronco mesenquimais em hepatócitos. Oh et al. (2000) mostraram o aumento na expressão dos transcritos de albumina (ALB) em células da medula óssea de ratos quando cultivadas com HGF. Desde então, vários trabalhos demonstraram a aquisição ou o aumento na expressão dos principais marcadores hepatocíticos pelas CTM. Recentemente, Lee et al. (2004) utilizaram, em CTM humanas da medula óssea, um protocolo de diferenciação que consistiu em duas etapas; a primeira foi realizada com a adição de HGF, FGF e nicotinamida para a diferenciação celular, e a segunda, foi realizada com a adição de oncostatina M, dexametasona e ITS<sup>+</sup> premix (insulina, transferrina e ácido selenoso) para a maturação celular. Taléns-Visconti e colaboradores (2006, 2007) aplicaram esse mesmo protocolo em CTM humanas do tecido adiposo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de diferenciação das CTM humanas em hepatócitos utilizando o protocolo de indução *in vitro* já descrito (Lee et al., 2004) e investigar o comportamento das mesmas frente ao dano hepático *in vivo*.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### ***Isolamento e cultivo das CTM***

As CTM foram isoladas da medula óssea de doadores do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto, e a sua utilização foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do mesmo hospital (processo no. 1783/2004). Após a punção realizada na crista ilíaca, o material foi centrifugado em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Boyum, 1968) e as células mononucleares foram coletadas. Para o isolamento das CTM foi utilizado o protocolo clássico de expansão por aderência em plástico (Friedenstein et al., 1976), seguida de sucessivas passagens celulares para o enriquecimento da população mesenquimal.

### ***Caracterização das CTM***

Ao longo do período de cultivo, a morfologia das CTM foi observada por meio da microscopia óptica. Para a caracterização imunofenotípica foi utilizado um painel contendo 15 anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos específicos na membrana das células e que são conjugados com uma molécula fluorescente, como mostra a Tabela 1. Após a marcação, as células foram analisadas pelo aparelho FACSort com a utilização do *software* CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). A multi-potencialidade das células também foi investigada. Para isso, as células foram cultivadas com os meios de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos e



posteriormente coradas com Sudan II – Escarlata, Von Kossa e submetidas à reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-colágeno tipo II, respectivamente.

### ***Indução de CTM à diferenciação hepatocítica***

Este protocolo foi primeiramente descrito em 2004 (Lee et al., 2004). As células foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEN contendo 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 60 a 80% de confluência. Para a realização da indução o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com solução salina 0,9% (p/v) tamponada para retirar todo o SFB do ambiente celular. Em seguida, o meio IMDM contendo 20ng/mL de EGF e 10ng/mL de FGFb foi adicionado e desta maneira as células foram privadas de SFB. Após dois dias, todo o meio foi retirado e o meio IMDM contendo 20ng/mL de HGF, 10ng/mL de FGFb e 0,6g/L de nicotinamida foi adicionado. Durante sete dias as células permaneceram com o meio de diferenciação, que foi trocado apenas uma vez. Em seguida, todo o meio foi substituído por IMDM contendo 20ng/mL de OSM, 1 $\mu$ Mol/L de dexametasona e 50ng/mL de ITS<sup>+</sup> *premix* foi adicionado. Por até vinte e oito dias as células permaneceram com esse meio de maturação, que foi trocado uma vez a cada sete dias.

### ***Análise morfológica e imunofenotípica das células induzidas***

A morfologia das células, bem como a porcentagem de células positivas para cada um dos 15 marcadores imunofenotípicos também foram analisadas após a indução da diferenciação hepatocítica.

### ***Análise molecular por RT-PCR em tempo real***

O RNA total foi extraído de aproximadamente 2x10<sup>5</sup> células de cada amostra usando-se tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Chomczynski & Sacchi, 1987). A transcrição reversa foi realizada com aproximadamente 2 $\mu$ g de RNA, com a utilização

do *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, USA). Foi realizada a quantificação relativa dos marcadores hepatocíticos ALB, citoqueratina 18 (CK18) e citoqueratina 19 (CK19) pelo método comparativo. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. Os reagentes pré-desenvolvidos ALB (Hs00609411\_m1) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) (PN: 4310884E) (Applied Biosystems, Foster City, USA) foram empregados para os ensaios TaqMan. Os oligonucleotídeos utilizados para os ensaios SYBR Green estão representados na Tabela 2. Para a amplificação dos transcritos foram utilizados os *kits* SYBR Green PCR Master Mix e TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). As condições de amplificações foram 2min. a 50°C e 10min. a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 95°C durante 15seg. e 60°C durante 1min.

#### ***Análise da produção de proteínas hepatocíticas por imunofluorescência***

As células, anteriormente cultivadas e diferenciadas em lamínulas, foram fixadas com paraformaldeído 2% (p/v) e permeabilizadas com Triton X-100 0,3% (v/v). O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado durante 60min. com PBS 1X, acrescido de albumina bovina 1% (v/v) e soro de cabra 10% (v/v). As amostras foram separadamente incubadas com 10ug/mL dos anticorpos primários anti-ALB humana, anti-CK18 humana e anti-alfa-fetoproteína (anti-AFP) humana, durante 60min. Posteriormente foram realizadas incubações com 1ug/mL dos anticorpos secundários anti-IgG conjugado com FITC (albumina e alfa-fetoproteína) ou anti-IgG conjugado com PE (CK18) durante 30min. O núcleo das células foi corado com DAPI e as lâminas foram posteriormente montadas com Fluoromont G. A análise foi feita em microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axioskop 2.0. As imagens foram capturadas

com a câmara digital AxioCam e analisadas com o auxílio do *software* AxionVision 3.0 (Carl Zeiss, Thornwood, USA).

#### ***Análise da secreção de albumina***

Aproximadamente  $2 \times 10^5$  células foram cultivadas em meio desprovido de metionina durante 2h. Após esse período, 150 uCI de metionina [ $S^{35}$ ] foi adicionado ao meio e deixado 16h. O sobrenadante das células foi coletado e as proteínas totais foram preparadas para a aplicação no gel de poliacrilamida a 12% (p/v). A eletroforese foi realizada a 150V durante aproximadamente 80min. O gel foi corado com azul brilhante de Comassie durante 16h, descorado por 4h e exposto ao filme de raio-X em cassetes apropriados durante 2, 24 e 72h para a auto-radiografia.

#### ***Infusão de CTM humanas em camundongos imunodeficientes com dano hepático induzido***

Camundongos fêmeas da linhagem NOD SCID (n = 16) foram induzidos ao dano hepático pela administração de 0,5mg/Kg de tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) via intra-peritoneal. O tratamento com a droga foi realizado durante 4 semanas. As injeções eram administradas duas vezes por semana. Após 24 horas da administração da última dose da droga os animais foram divididos em dois grupos (n = 8). O grupo A recebeu  $1 \times 10^6$  CTM isoladas as medula óssea de um doador do sexo masculino diluídas em 100uL de PBS 1X e o grupo B recebeu apenas 100uL de PBS 1X (controle). A infusão foi realizada via intra-venosa, na veia caudal lateral dos animais. Após 10 dias, os animais foram sacrificados e tiveram o fígado retirado para as análises. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto (processo no. 06.1.364.53.0).

#### ***Análise do tecido hepático murino para a presença de CTM humanas***

O DNA genômico do tecido hepático dos animais foi extraído e utilizado como molde para a Nested-PCR. Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para amplificar a região codificadora do gene SRY humano. Na primeira etapa de amplificação, a mistura reacional de volume final 25uL continha 1ug de DNA e 20pmoles de cada oligonucleotídeo externo: P5FAESRY (P5'-GAATATTCCCGCTCTCCGGA-P3') e P3FAMESRY (P5'-GTACAACCTGTTGTCCAGTTG-P3'). Foram realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 57°C. Na segunda etapa de amplificação, a mistura reacional de volume final 25uL continha 5uL do produto da primeira reação e 20pmoles de cada oligonucleotídeo interno: P5FAISRY (P5'-CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT-P3') e P3FAMISRY (P5'-GACGAGGTCGATACTTATAATTTCG-P3'). Foram realizados 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60°C. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e visualizados sobre luz U.V. a 302nm.

## **RESULTADOS**

### ***Caracterização das CTM***

As células isoladas apresentaram morfologia fibroblastóide, com núcleo bem delimitado, dois ou três nucléolos bem evidentes e o citoplasma com limites imprecisos. Também apresentaram formação de “tapete celular” quando em alta confluência, como mostra a Figura 1. O perfil imunofenotípico das células está representado na Tabela 3, com a porcentagem de células positivas para cada marcador.

O potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos foi observado, como mostra a Figura 2. As células isoladas apresentaram características morfológicas, imunofenotípicas e potencial de diferenciação de CTM.

### ***Indução a diferenciação hepatocítica in vitro***

#### *Análise morfológica por microscopia de luz*

Durante a primeira semana de indução as células não apresentaram mudanças significativas, mantendo a morfologia fibroblastóide. A partir da segunda semana foi observada a retração das projeções citoplasmáticas. O desenvolvimento da morfologia poligonal foi visualizado ao longo do período, como mostra a Figura 3, sugerindo que após a indução à diferenciação hepatocítica, as CTM sofrem alterações morfológicas e adquirem a forma semelhante à de hepatócitos.

#### *Análise imunofenotípica por citometria de fluxo*

O perfil imunofenotípico das CTM foi investigado após a indução à diferenciação hepatocítica nos dias 14, 21 e 28. A expressão da maioria dos marcadores de CTM não foi alterada. Foi observada a diminuição da expressão do marcador CD29 após vinte e oito dias, porém, esse resultado não se manteve. O marcador CD54 se mostrou aumentado após 28 e 35, como mostra a Tabela 3. Os resultados sugerem que a metodologia de indução a diferenciação hepatocítica utilizada neste trabalho não alterou o perfil de expressão dos marcadores de CTM nas células analisadas.

#### *Análise da expressão dos transcritos de ALB, CK18 e CK19 por RT-PCR em tempo real*

Foram utilizadas quatro amostras de CTM isoladas de doadores diferentes. Níveis basais dos transcritos de ALB, CK18 e CK19 foram detectados antes da indução à diferenciação e as amostras das células no dia zero puderam ser utilizadas como calibrador. Aplicando-se a mediana das amostras em cada ponto (D2, D7, D14, D21 e D28) é possível observar a redução na expressão dos três marcadores ao longo da indução, como mostra a Figura 4. Esses resultados sugerem que as CTM, quando

induzidas à diferenciação pela metodologia utilizada neste trabalho, não expressam os transcritos de 3 dos principais marcadores hepatocíticos

*Análise da produção de ALB, CK18 e AFP por imunofluorescência*

As CTM apresentaram positividade para a marcação com o anticorpo anti-ALB, antes e após a indução à diferenciação, e não mostraram positividade para as marcações com os anticorpos anti-CK18 e anti-AFP, o que pôde ser visualizado após a segunda marcação com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado (dados não mostrados). As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo. As amostras não apresentaram positividade quando submetidas à marcação apenas com os anticorpos secundários, o que foi utilizado como controle negativo da reação. Os resultados sugerem que a biologia das CTM quanto à produção de três dos principais marcadores hepatocíticos não foi alterada pela metodologia utilizada neste trabalho.

*Análise da secreção de albumina por eletroforese de proteínas*

Após a marcação com a metionina radioativa, o sobrenadante contendo todas as proteínas secretadas foi coletado e concentrado. Parte desse sobrenadante foi preparado e aplicado no gel de poliacrilamida 12% (m/v). Após a eletroforese, o gel foi corado para a visualização das bandas referentes às proteínas totais das amostras. A banda esperada de 66 kDa, tamanho referente ao da albumina, foi visualizada nas amostras de CTM antes e após a indução à diferenciação. As células da linhagem Hep G2 foram utilizadas como controle positivo, como mostra a Figura 5A. A auto-radiografia do gel foi realizada com exposições durante os tempos: 2 h, 24 h e 72 h. Não houve diferença entre os tempos de exposição. A banda de 66 kDa visualizada no gel não apareceu na auto-radiografia das amostras de CTM induzidas e não induzidas, e foi visualizada somente na amostra controle, como mostra a Figura 5B. A Figura 5C mostra a

sobreposição do gel com o filme. Os resultados sugerem que as CTM não passam e expressar albumina quando induzidas a diferenciação hepatocítica pela metodologia utilizada neste trabalho.

#### ***Análise da presença de CTM masculinas no tecido hepático de camundongos fêmeas por Nested-PCR***

Uma banda de 265pb, tamanho referente ao da região codificadora do gene SRY humano, foi visualizada no gel de agarose indicando que CTM humanas foram encontradas no fígado danificado de um dos camundongos transplantados, como mostra a Figura 6.

#### ***DISCUSSÃO***

Investigou-se o potencial hepatocítico das CTM da medula óssea frente à indução *in vitro* e *in vivo*. Os experimentos *in vitro* foram montados de acordo com o descrito por Lee e et al. (2004). Em concordância com estes autores, observou-se a morfologia poligonal e a presença de estruturas granulares por volta da quarta semana após a indução. Porém, ao contrário do encontrado por Lee et al., as células induzidas à diferenciação hepatocítica, apesar de terem adquirido uma morfologia semelhante a do hepatócito, não apresentaram modificações no seu perfil imunofenotípico. Após 14, 21 e 28 de indução, as células permaneceram com altos níveis de expressão para os marcadores de CTM. Níveis basais dos principais marcadores hepatocíticos (ALB, CK18 e CK19) foram detectados pela técnica de RT-PCR em tempo real nas células não induzidas. Porém, as células induzidas durante 2, 7, 14, 21 e 28 dias também não aumentaram os níveis de expressão desses transcritos. Esses resultados foram condizentes com os observados pela técnica de imunofluorescência; as células induzidas durante 14, 21 e 28 dias não apresentaram diferenças na produção dos marcadores ALB,

CK18 e AFP, em relação às não induzidas. A fraca positividade para o anticorpo anti-ALB apresentada pelas células antes e após a indução foi investigada pela marcação das mesmas com aminoácido radioativo e posterior eletroforese de proteínas. Uma banda do tamanho aproximado da albumina (66 kDa) foi visualizada no gel da eletroforese. Todavia, quando esse mesmo gel foi submetido à auto-radiografia a banda de 66 kDa não foi visualizada. Esse resultado sugere que as células não induzidas e induzidas não produzem albumina. A albumina detectada na imunofluorescência e na eletroforese pode ser um contaminante do meio utilizado inicialmente para a expansão das CTM, que ainda apresentava soro fetal bovino em sua composição. Após 28 dias de cultivo, um grande número de células entrou em apoptose e se despreendeu da placa, inviabilizando a investigação mais tardia. Taléns-Visconti et al. (2006) analisaram as células induzidas à diferenciação hepatocítica por até 21 dias. Os autores fizeram a comparação entre CTM isoladas da medula óssea e do tecido adiposo. As modificações morfológicas foram condizentes com as observadas em nosso trabalho, após 21 dias as células apresentaram uma morfologia semelhante a do hepatócito. As análises foram feitas em 7, 14 e 21 dias pós-indução e os resultados revelaram o aumento na produção dos transcritos de albumina, HNF4 $\alpha$  e C/EBP $\beta$ , a diminuição do marcador de superfície celular CD90 ao longo do período de indução hepatocítica, especialmente nas CTM do tecido adiposo, e a produção de ALB e AFP por imunofluorescência. Contudo, não foi detectado o aumento dos transcritos de CK18 e CK19, dois importantes marcadores de hepatócitos. Seo et al. (2005) utilizando em CTM do tecido adiposo uma metodologia mais simplificada de indução a diferenciação hepatocítica, baseada no cultivo das células com meio sem SFB e acrescido de DMSO, HGF e OSM, relataram o aumento na expressão dos marcadores ALB e AFP. Porém, os autores também não observaram o



aumento na expressão dos marcadores CK18 e CK19, o que indica que as células não se diferenciaram em hepatócitos. Muitos trabalhos, como o de Lee et al. (2004), relatam que CTM extra-hepáticas podem ser induzidas à aquisição de marcadores hepatocíticos específicos pelo cultivo *in vitro* com fatores de crescimento e citocinas. Essas observações levam a comunidade científica a classificar tipos celulares originados a partir de células-tronco como hepatócitos. A aplicação do termo hepatócitos para tais células pode não estar correta. A elucidação de alguns mecanismos como a perda da expressão de alguns fatores de transcrição ou a modificação de transdutores de sinais deve ser priorizada. A modificação da morfologia ou a aquisição de alguns marcadores hepatocíticos não devem ser suficientes para categorizarmos os tipos celulares gerados a partir das CTM como hepatócitos.

O comportamento das CTM da medula óssea frente ao dano hepático *in vivo* também foi investigado. O dano foi anteriormente estabelecido pela administração de CCl<sub>4</sub> e demonstrado pela alteração das transaminases hepáticas no soro e pela presença de uma extensa área danificada, microscopicamente visualizada, no fígado dos animais tratados (dados não mostrados). Passados 10 dias dos transplantes, DNA humano foi detectado no fígado de um dos animais, indicando que as CTM transplantadas migraram para o tecido hepático murino danificado. O potencial migratório das CTM da medula óssea para o tecido hepático danificado sugere que estas células possuem um papel na regeneração hepática. Porém, os resultados obtidos *in vitro* nos impele a olhar para o efeito parácrino que as CTM exercem sobre os órgãos e tecidos. Recentemente, Russo et al. (2006) realizaram o transplante da medula óssea de camundongos machos em fêmeas irradiadas e, após a confirmação da re-população da medula óssea, induziu os receptores ao dano hepático. Células dos animais doadores foram localizadas no fígado dos

receptores. Os resultados adquiridos sugerem o recrutamento e a contribuição das células da medula óssea, predominantemente das CTM, durante o dano crônico do fígado. Porém, essas células não mostraram indícios de diferenciação em hepatócitos ou de re-população do parênquima hepático. Sabemos que as células estreladas, além de serem ativadas durante a injúria tecidual diferenciando-se em miofibroblastos, também contribuem para o reparo do tecido secretando fatores de crescimento que irão agir na proliferação dos hepatócitos (Schirmidt et al., 1995). Da mesma forma, as CTM exercem um efeito imunomodulatório sobre tecidos e órgãos danificados, o que é inclusive uma das teorias mais aceitas pelos pesquisadores para explicar o papel das mesmas na reconstituição ou melhora dos tecidos. A hipótese de que as CTM da medula óssea são células equivalentes às células estreladas no fígado corrobora com a literatura recente (Covas et al., 2008) e também explicaria os resultados obtidos.

Em conclusão, a indução da diferenciação hepatocítica *in vitro* a partir das CTM da medula óssea, apesar de induzir as células à aquisição de uma morfologia semelhante à do hepatócito, não foi eficaz para induzir a aquisição de importantes marcadores hepatocíticos, de acordo com as condições estabelecidas. Entre as quatro amostras testadas, apenas uma apresentou o aumento da expressão dos transcritos de albumina e ainda assim, não mostrou o aumento dos níveis de expressão da proteína, como visualizado por imunofluorescência e por eletroforese. As CTM da medula óssea mostraram potencial migratório para o tecido hepático danificado quando investigadas *in vivo*, o que sugere que estas células podem participar no processo de restauração do fígado.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o apoio técnico dos funcionários do Laboratório de Pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto: Karina Solano e Sâmia Caruso (cultura de células), Patrícia Palma e Camila (citometria de fluxo), Rochele Azevedo (RT-PCR em tempo real) e Luis Alberto Andrade (eletroforese de proteínas). Agradecemos também a técnica Vani Corrêa do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP pelo auxílio com a imunofluorescência, e a Profa. Dra. Maria Júlia Manso do IQ da USP-SP pela disponibilização do laboratório e do material radioativo. O suporte financeiro para a realização deste estudo foi disponibilizado pelo CTC-CEPID-FAPESP.

#### ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425(6961):968-73.

Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97:77-89.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9.

Covas DT, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146<sup>+</sup> perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* 2008.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5):267-74.

Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 2001; 497(1):15-9.

Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnem JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; 305(5680):90-3.

Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284(5422):1998-2003.

Kamiya A, et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999; 18(8):2127-36.

Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40(6):1275-84.

Michalopoulos GK, Bowen WC, Mulè K, Luo J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 2003;11(2):55-75.

Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11(3):177-83.

Nishizaki T, Takenaka K, Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Shirabe K, Sugimachi K. Alteration in levels of human hepatocyte growth factor following hepatectomy. *J Am Coll Surg* 1995; 181(1):6-10.

Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279(2):500-4.

Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007a; 363(2):247-252.

Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS ONE* 2007b; 2(9):941.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417):1168-70.

Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130(6):1807-21.

Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373(6516):699-702.

Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(1):258-64.

Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(36):5834-45.

Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(2):324-9.

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000a;31(1):235-40.

Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000b; 32(1):11-6.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422(6934):901-4.

Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JÁ. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101(10):4201-8.

Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000; 127(8):1563-72.

### TABELAS

**Tabela 1:** Anticorpos monoclonais utilizados para a caracterização imunofenotípica das CTM humanas por citometria de fluxo.

Anticorpos	Molécula conjugada	Clone	Marca *
CD45	FITC	2D1	BD Biosciences
CD14	PE	M5E2	BD Bioscience
HLA-classel	PE	G46-2.6	Pharmingen
HLA-DR	FITC	G46-6(L243)	Pharmingen
CD34	PE	563	BD Biosciences
CD73	PE	AD2	Pharmingen
CD49e	PE	IIA1	Pharmingen
CD51/61	FITC	23C6	Pharmingen
CD44	PE	515	Pharmingen
CD29	PE	HUTS-21	Pharmingen
CD13	PE	WM15	Pharmingen
CD90	PE	5E10	Pharmingen
CD105		266	Pharmingen
KDR		KDR-1	Sigma
CD54	PE	HA58	Pharmingen
Isotipo controle (IgG <sub>2a</sub> /IgG <sub>1</sub> )	FITC/PE	X39/X40	BD Biosciences
Anti-IgG de camundongo	FITC	policlonal	BD Biosciences
Anti-IgM de camundongo	FITC	policlonal	Caltag

\* Pharmingen (San Diego, USA), Sigma (St. Louis, USA), R&D Systems (Minneapolis, USA), Dako (Glostrup, Dinamarca) e Caltag (Burlingame, USA).

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos marcadores hepatocíticos citoqueratina 18 e citoqueratina 19 e do controle endógeno gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, empregados na técnica de RT-PCR em tempo real para ensaios SYBR Green.

Gene	Sequência	Posição	Tempertatura de <i>melting</i> (T.M.)
<b>CK 18 (P5')</b>	5'-TGGAAGATGGCGAGGACTTT-3'	1.266 – 1.285	58°C
<b>CK18 (P3')</b>	5'-AGACACCACTTTGCCATCCACTA-3'	1.353 – 1.375	60°C
<b>CK 19 (P5')</b>	5'-GAGCAGGTCCGAGGTTACTGA-3'	1.008 – 1.028	58°C
<b>CK19 (P3')</b>	5'-CCGTTTCTGCCAGTGTGTCTT-3'	1.097 – 1.117	59°C
<b>GAPDH (P5')</b>	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'	539 – 551	62°C
<b>GAPDH (P3')</b>	5'-CATGACTGTGGTCATGAGTCCT-3'	618 – 640	60°C

**Tabela 3:** Porcentagem das células isoladas dos tecidos adultos e fetais positivas para os respectivos marcadores de superfície celular.

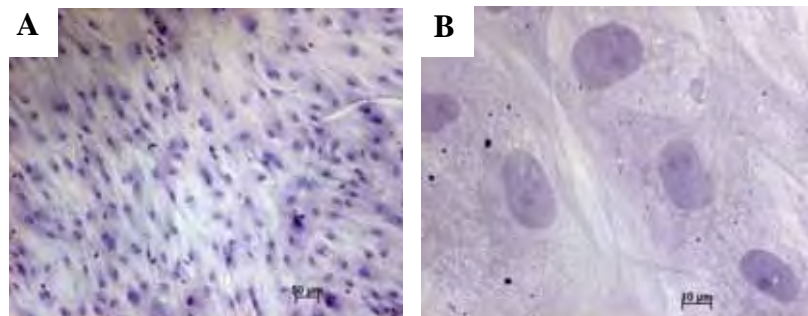
	MO14	MO16	MO17	MO24
<b>CD45</b>	0	0	0	0
<b>CD14</b>	0	0	0	0
<b>Classe I</b>	24	81	70	52
<b>HLA-DR</b>	3	0	0	1
<b>CD34</b>	0	0	0	0
<b>CD73</b>	59	95	61	77
<b>CD49e</b>	66	63	60	89
<b>CD51/61</b>	0	ND	0	2
<b>CD44</b>	91	77	78	80
<b>CD29</b>	81	97	84	90
<b>CD13</b>	91	98	88	94
<b>CD90</b>	98	98	99	93
<b>CD105</b>	6	74	86	37
<b>KDR</b>	0	1	2	0
<b>CD54</b>	16	1	4	31



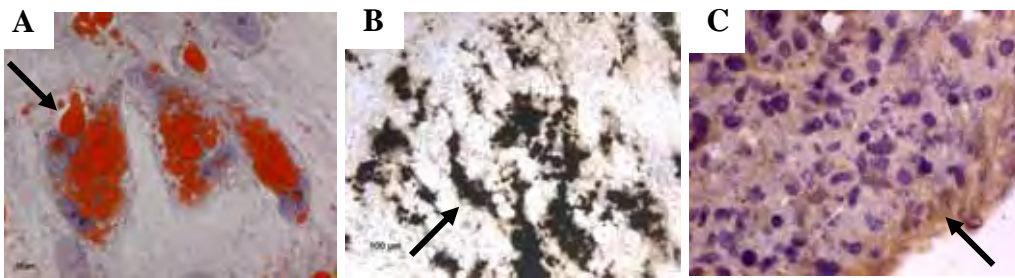
**Tabela 4:** Porcentagem aproximada da expressão dos marcadores imunofenotípicos de CTM antes e após a indução a diferenciação hepatocítica em diferentes tempos.

	MO24	D14	D21	D28
CD45	0	0	0	0
CD14	0	0	0	5
Classe I	52	92	18	88
HLA-DR	1	1	0	1
CD34	0	0	0	1
CD73	77	97	83	95
CD49e	89	97	83	95
CD51/61	2	0	0	0
CD44	80	97	79	93
CD29	90	97	69	97
CD13	94	98	98	98
CD90	93	99	99	98
CD105	37	ND	ND	56
KDR	0	ND	ND	0
CD54	31	21	47	79

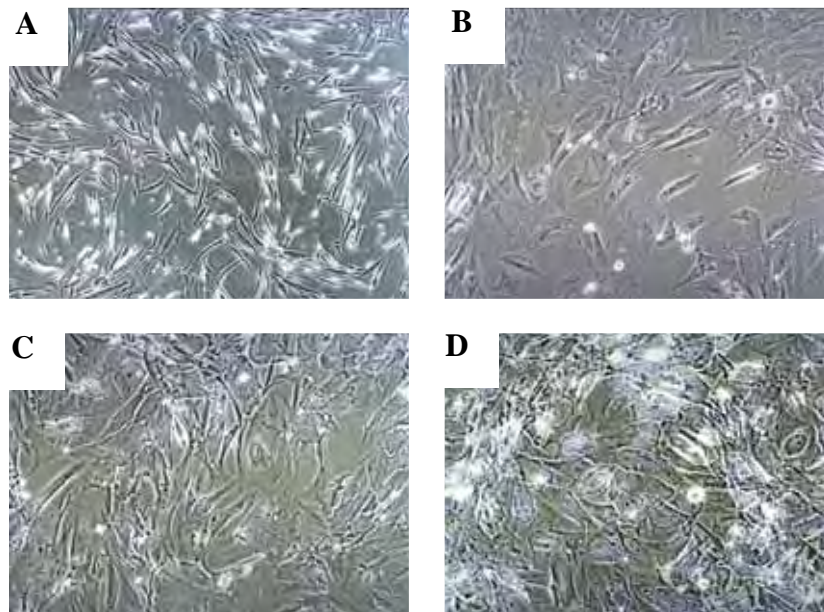
## FIGURAS



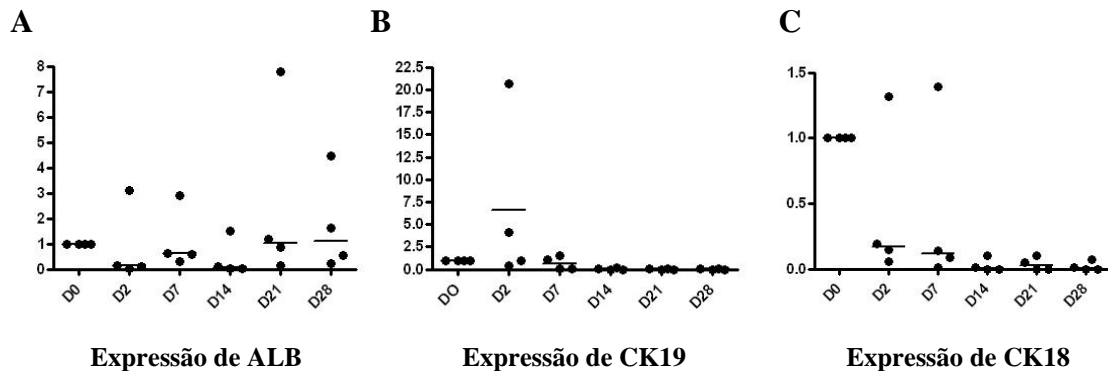
**Figura 1:** Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea humana. A) Células com aproximadamente 90% de confluência coradas com Hematoxilina de Harris, aumento de 40X. B) Aumento de 630X



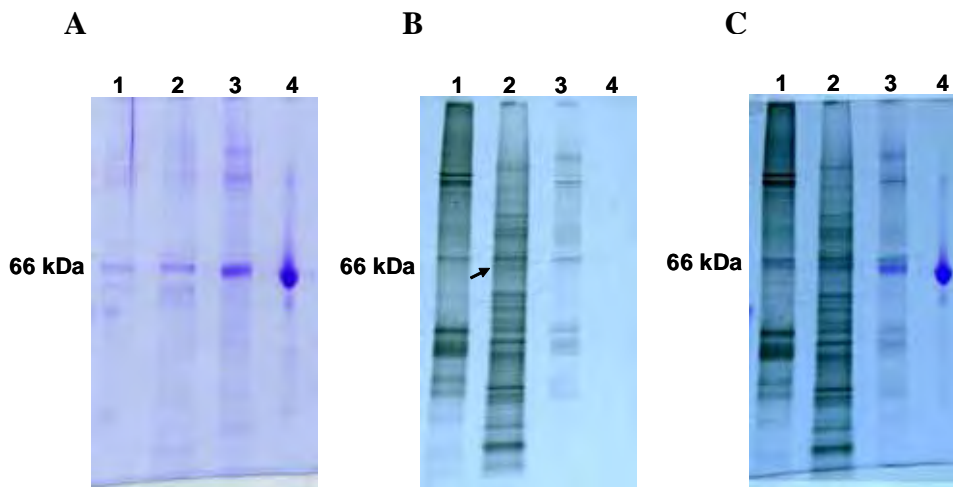
**Figura 2:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação. A) Diferenciação adipogênica: a seta aponta para as gotículas de gordura no citoplasma das células, coloração com Sudan II – Escarlata e Hematoxilina de Harris, aumento de 630X. B) Diferenciação osteogênica: a seta aponta para a deposição de cristais de cálcio, coloração com Von Kossa e Hematoxilina de Harris, aumento de 100X e C) Diferenciação condrogênica: a seta aponta para o colágeno produzido pelas células, imunohistoquímica para Colágeno II, aumento de 630X.



**Figura 3:** Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação hepatocítica, aumento de 100X. A) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 7 dias (D07). B) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 14 dias (D14). C) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias (D21). D) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 28 dias (D28).

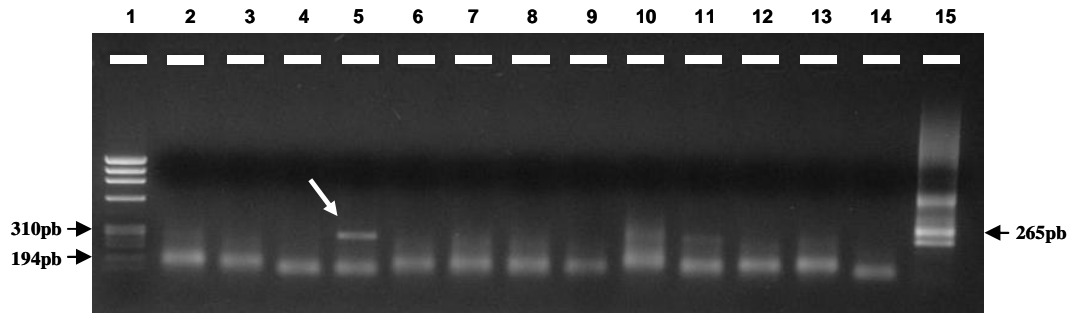


**Figura 4:** Perfil de expressão dos marcadores hepatocíticos em 4 diferentes amostras de CTM induzidas à diferenciação hepatocítica, nos pontos: dia 0 (D0), dia 2 (D2), dia 7 (D7), dia 14 (D14), dia 21 (D21) e dia 28 (D28), analisadas por RT-PCR em tempo real.



**Figura 5:** Perfil eletroforético de proteínas totais em gel de poliacrilamida 12% (p/v) (SDS-PAGE). Coluna 1: Sobrenadante de células CTM após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica, cultivadas durante 26h em meio sem SFB. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 cultivadas durante 26h em meio sem SFB. Coluna 3: Sobrenadante de CTM cultivadas durante 26h em meio sem SFB. Coluna 4: Albumina humana comercial 2ug/dL (controle positivo). A) Gel. A banda de 66 kDa (tamanho referente ao da albumina) foi observada no gel em todas as amostras. B) Autoradiografia do gel. A seta aponta para a banda de 66 kDa produzida pelas células Hep

G2. As demais amostras não mostraram a produção de nenhuma banda de 66 kDa. C) Sobreposição de A e B: gel e auto-radiografia do gel.



**Figura 6:** Análise do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). A) Coluna 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ X. Colunas 2 a 5: Fígado do animal no.1. Colunas 6 a 9: Fígado do animal no.2. Colunas 10 a 13: Fígado do animal no.3. Coluna 14: Fígado do animal no.4. Coluna 15: Sangue humano masculino (controle positivo). A seta indica a banda de 265pb, tamanho referente ao produto do gene SRY humano.

## **9 – ANEXOS**

**ANEXO A** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da M.O. induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de CK18 por RT-PCR em tempo real.

.

**ANEXO B** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da RET induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de CK18 por RT-PCR em tempo real.

**ANEXO C** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da M.O. induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de CK19 por RT-PCR em tempo real.

**ANEXO D** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da RET induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de CK19 por RT-PCR em tempo real.

**ANEXO E** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da M.O. induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de ALB por RT-PCR em tempo real.

**ANEXO F** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes às amostras de CTM da RET induzidas à diferenciação hepatocítica para a expressão de ALB por RT-PCR em tempo real.

**ANEXO G** – Planilha contendo os resultados e os cálculos referentes a todas as amostras de CTM para a expressão de ALB por RT-PCR em tempo real.

## ANEXO A

amostra		CT CK18	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>^</sup> ddCT
MO14 D0	CK18	18,25	18,25	15,18	15,35	<b>2,90</b>	0,00	1,00
MO14 D0	CK18	18,25		15,52				
MO14 D2	CK18	19,28	19,62	12,78	12,77	6,85	3,95	0,06
MO14 D2	CK18	19,96		12,76				
MO14 D7	CK18	21,55	21,87	15,47	15,52	6,35	3,45	0,09
MO14 D7	CK18	22,19		15,57				
MO14 D14	CK18	26,05	25,71	15,39	15,07	10,64	7,74	0,00
MO14 D14	CK18	25,37		14,75				
MO14 D21	CK18	27,72	27,79	14,24	14,98	12,82	9,92	0,00
MO14 D21	CK18	27,86		15,71				
MO14 D28	CK18	29,39	28,49	13,18	13,88	14,61	11,71	0,00
MO14 D28	CK18	27,59		14,58				
MO16 D0	CK18	18,87	19,09	19,46	20,60	<b>-1,51</b>	0,01	1,00
MO16 D0	CK18	19,31		21,73				
MO16 D2	CK18	24,13	24,36	25,18	23,13	1,23	2,74	0,15
MO16 D2	CK18	24,59		21,08				
MO16 D7	CK18	23,97	24,00	19,52	19,45	4,55	6,06	0,01
MO16 D7	CK18	24,02		19,37				
MO16 D14	CK18	27,25	27,34	20,12	20,20	7,15	8,66	0,00
MO16 D14	CK18	27,43		20,27				
MO16 D21	CK18	26,71	26,55	19,62	19,87	6,68	8,19	0,00
MO16 D21	CK18	26,38		20,12				
MO16 D28	CK18	30,84	30,03	20,10	20,18	9,85	11,36	0,00
MO16 D28	CK18	29,22		20,26				
MO17 D0	CK18	20,95	20,71	18,11	18,35	<b>2,36</b>	-0,01	1,00
MO17 D0	CK18	20,46		18,59				
MO17 D2	CK18	22,63	22,67	17,76	17,95	4,72	2,36	0,19
MO17 D2	CK18	22,71		18,14				
MO17 D7	CK18	23,84	24,40	19,17	19,17	5,23	2,87	0,14
MO17 D7	CK18	24,96		19,17				
MO17 D14	CK18	25,60	25,87	17,19	17,30	8,58	6,22	0,01
MO17 D14	CK18	26,14		17,40				
MO17 D21	CK18	25,20	25,61	18,56	18,92	6,70	4,34	0,05
MO17 D21	CK18	26,02		19,27				
MO17 D28	CK18	29,17	29,17	19,35	19,28	9,89	7,53	0,01
MO17 D28	CK18	29,17		19,21				
MO24 D0	CK18	22,79	23,46	15,14	15,75	<b>7,71</b>	-0,01	1,00
MO24 D0	CK18	24,12		16,36				
MO24 D2	CK18	21,51	21,89	14,33	14,58	7,31	-0,40	1,32
MO24 D2	CK18	22,26		14,82				
MO24 D7	CK18	22,09	22,94	15,55	15,70	7,24	-0,47	1,39
MO24 D7	CK18	23,78		15,84				
MO24 D14	CK18	25,47	26,37	15,42	15,33	11,04	3,33	0,10
MO24 D14	CK18	27,27		15,24				
MO24 D21	CK18	26,47	27,29	15,48	16,23	11,06	3,35	0,10
MO24 D21	CK18	28,10		16,97				
MO24 D28	CK18	29,07	29,67	18,01	18,04	11,63	3,92	0,07
MO24 D28	CK18	30,26		18,07				



## ANEXO B

amostra		CT CK18	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>ddCT</sup>
RETINA2 D0	CK18	17,56	17,94	17,15	17,41	<b>0,53</b>	0,00	1,00
RETINA2 D0	CK18	18,32		17,67				
RETINA2 D2	CK18	15,15	15,15	15,00	14,88	0,28	-0,26	1,19
RETINA2 D2	CK18	15,15		14,75				
RETINA2 D7	CK18	16,62	16,31	14,07	13,94	2,37	1,84	0,28
RETINA2 D7	CK18	15,99		13,81				
RETINA2 D14	CK18	17,64	17,80	15,79	15,60	2,20	1,67	0,31
RETINA2 D14	CK18	17,95		15,40				
RETINA2 D21	CK18	18,03	18,03	13,80	13,99	4,05	3,52	0,09
RETINA2 D21	CK18	18,03		14,17				
RETINA2 D28	CK18	20,75	20,49	15,19	15,32	5,17	4,64	0,04
RETINA2 D28	CK18	20,22		15,45				





## ANEXO C

amostra		CT CK19	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>Δ</sup> ddCT
MO14 D0	CK19	27,98	28,36	15,18	15,35	<b>13,01</b>	0,00	1,00
MO14 D0	CK19	28,74		15,52				
MO14 D2	CK19	21,94	21,41	12,78	12,77	8,64	-4,37	20,68
MO14 D2	CK19	20,88		12,76				
MO14 D7	CK19	28,15	27,96	15,47	15,52	12,44	-0,58	1,49
MO14 D7	CK19	27,76		15,57				
MO14 D14	CK19	30,36	30,93	15,39	15,07	15,86	2,85	0,14
MO14 D14	CK19	31,50		14,75				
MO14 D21	CK19	32,05	32,54	14,24	14,98	17,57	4,56	0,04
MO14 D21	CK19	33,03		15,71				
MO14 D28	CK19	33,33	32,81	13,18	13,88	18,93	5,92	0,02
MO14 D28	CK19	32,28		14,58				
MO16 D0	CK19	21,35	21,78	19,46	20,60	<b>1,18</b>	0,00	1,00
MO16 D0	CK19	22,20		21,73				
MO16 D2	CK19	25,47	25,57	25,18	23,13	2,44	1,26	0,42
MO16 D2	CK19	25,66		21,08				
MO16 D7	CK19	25,73	26,31	19,52	19,45	6,86	5,68	0,02
MO16 D7	CK19	26,88		19,37				
MO16 D14	CK19	32,61	32,23	20,12	20,20	12,03	10,85	0,00
MO16 D14	CK19	31,84		20,27				
MO16 D21	CK19	29,30	29,35	19,62	19,87	9,48	8,30	0,00
MO16 D21	CK19	29,39		20,12				
MO16 D28	CK19	34,57	34,20	20,10	20,18	14,02	12,84	0,00
MO16 D28	CK19	33,82		20,26				
MO17 D0	CK19	26,92	27,00	18,11	18,35	<b>8,65</b>	0,00	1,00
MO17 D0	CK19	27,08		18,59				
MO17 D2	CK19	24,54	24,56	17,76	17,95	6,61	-2,05	4,13
MO17 D2	CK19	24,57		18,14				
MO17 D7	CK19	27,72	27,70	19,17	19,17	8,53	-0,13	1,09
MO17 D7	CK19	27,67		19,17				
MO17 D14	CK19	32,72	32,77	17,19	17,30	15,48	6,82	0,01
MO17 D14	CK19	32,82		17,40				
MO17 D21	CK19	35,39	35,39	18,56	18,92	16,48	7,83	0,00
MO17 D21	CK19	35,39		19,27				
MO17 D28	CK19	35,99	35,61	19,35	19,28	16,33	7,68	0,00
MO17 D28	CK19	35,22		19,21				
MO24 D0	CK19	26,22	25,79	15,14	15,75	<b>10,04</b>	0,00	1,00
MO24 D0	CK19	25,35		16,36				
MO24 D2	CK19	24,46	24,67	14,33	14,58	10,10	0,06	0,96
MO24 D2	CK19	24,88		14,82				
MO24 D7	CK19	28,83	28,92	15,55	15,70	13,22	3,18	0,11
MO24 D7	CK19	29,00		15,84				
MO24 D14	CK19	30,05	30,31	15,42	15,33	14,98	4,94	0,03
MO24 D14	CK19	30,57		15,24				
MO24 D21	CK19	30,14	30,50	15,48	16,23	14,27	4,23	0,05
MO24 D21	CK19	30,85		16,97				
MO24 D28	CK19	31,36	31,35	18,01	18,04	13,31	3,27	0,10
MO24 D28	CK19	31,33		18,07				



## ANEXO D

amostra		CT CK19	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>ddCT</sup>
RETINA2 D0	CK19	28,08	27,67	17,15	17,41	<b>10,26</b>	0,00	1,00
RETINA2 D0	CK19	27,26		17,67				
RETINA2 D2	CK19	23,28	23,28	15,00	14,88	8,41	-1,86	3,62
RETINA2 D2	CK19	23,28		14,75				
RETINA2 D7	CK19	24,54	23,94	14,07	13,94	10,00	-0,26	1,20
RETINA2 D7	CK19	23,34		13,81				
RETINA2 D14	CK19	27,43	27,23	15,79	15,60	11,64	1,38	0,39
RETINA2 D14	CK19	27,03		15,40				
RETINA2 D21	CK19	29,00	29,50	13,80	13,99	15,51	5,25	0,03
RETINA2 D21	CK19	29,99		14,17				
RETINA2 D28	CK19	27,25	27,93	15,19	15,32	12,61	2,35	0,20
RETINA2 D28	CK19	28,61		15,45				



## ANEXO E

amostras		CT ALB	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>^</sup> ddCT
MO14 D0	ALB	30,46	31,08	16,17	16,37	<b>14,71</b>	0,00	1,00
MO14 D0	ALB	31,69		16,57				
MO14 D2	ALB	31,80	31,94	13,92	14,41	17,53	2,82	0,14
MO14 D2	ALB	32,07		14,89				
MO14 D7	ALB		33,46	16,97	16,99	16,48	1,77	0,29
MO14 D7	ALB	33,46		17,00				
MO14 D14	ALB	34,19	33,77	15,97	15,76	18,01	3,30	0,10
MO14 D14	ALB	33,34		15,55				
MO14 D21	ALB	31,19	31,36	16,45	16,45	14,91	0,20	0,87
MO14 D21	ALB	31,52		16,45				
MO14 D28	ALB	33,77	33,49	16,58	16,56	16,93	2,22	0,21
MO14 D28	ALB	33,21		16,54				
MO16 D0	ALB	30,74	31,11	17,56	16,85	<b>14,26</b>	0,00	1,00
MO16 D0	ALB	31,48		16,14				
MO16 D2	ALB		#DIV/0!	22,51	22,36	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MO16 D2	ALB			22,20				
MO16 D7	ALB	35,41	35,41	20,56	20,46	14,95	0,69	0,62
MO16 D7	ALB			20,36				
MO16 D14	ALB		#DIV/0!	22,08	22,20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MO16 D14	ALB			22,32				
MO16 D21	ALB	35,40	35,40	21,39	21,37	14,03	-0,23	1,17
MO16 D21	ALB			21,35				
MO16 D28	ALB	35,46	35,46	21,77	21,91	13,55	-0,71	1,64
MO16 D28	ALB			22,05				
MO17 D0	ALB	33,73	33,80	19,66	19,63	<b>14,17</b>	0,00	1,00
MO17 D0	ALB	33,87		19,59				
MO17 D2	ALB	35,49	35,69	18,23	18,51	17,18	3,01	0,12
MO17 D2	ALB	35,88		18,78				
MO17 D7	ALB	34,29	34,95	20,07	20,04	14,91	0,74	0,60
MO17 D7	ALB	35,60		20,01				
MO17 D14	ALB		#DIV/0!	17,15	17,17	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
MO17 D14	ALB			17,18				
MO17 D21	ALB	36,00	36,00	18,79	18,92	17,08	2,91	0,13
MO17 D21	ALB	36,00		19,05				
MO17 D28	ALB	34,07	34,77	19,65	19,73	15,04	0,87	0,55
MO17 D28	ALB	35,47		19,81				
MO24 D0	ALB	33,51	32,90	16,56	17,34	<b>15,56</b>	0,00	1,00
MO24 D0	ALB	32,29		18,12				
MO24 D2	ALB	30,40	30,78	16,94	16,86	13,92	-1,64	3,12
MO24 D2	ALB	31,16		16,78				
MO24 D7	ALB	29,48	29,84	15,30	15,81	14,03	-1,53	2,89
MO24 D7	ALB	30,20		16,32				
MO24 D14	ALB	31,27	31,19	16,12	16,23	14,96	-0,60	1,52
MO24 D14	ALB	31,10		16,33				
MO24 D21	ALB	29,42	29,24	16,50	16,64	12,60	-2,96	7,78
MO24 D21	ALB	29,05		16,77				
MO24 D28	ALB	31,04	30,86	17,18	17,47	13,40	-2,17	4,48
MO24 D28	ALB	30,68		17,75				



## ANEXO F

amostras		CT ALB	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>ddCT</sup>
RETINA 2 D0	ALB	33,39	34,31	18,37	18,51	<b>15,80</b>	0,00	1,00
RETINA 2 D0	ALB	35,23		18,65				
RETINA2 D2	ALB	32,21	32,21	11,80	12,78	19,43	3,63	0,08
RETINA2 D2	ALB	32,21		13,76				
RETINA2 D7	ALB	34,09	34,63	14,35	14,34	20,29	4,49	0,04
RETINA2 D7	ALB	35,17		14,33				
RETINA2 D14	ALB	33,72	33,72	15,06	15,45	18,28	2,48	0,18
RETINA2 D14	ALB	33,72		15,83				
RETINA2 D21	ALB	32,84	32,07	14,11	14,09	17,98	2,18	0,22
RETINA2 D21	ALB	31,29		14,06				
RETINA2 D28	ALB	35,52	35,19	15,44	15,38	19,81	4,01	0,06
RETINA2 D28	ALB	34,85		15,31				





## ANEXO G

amostras		CT ALB	mCT	CT GAPDH	mCT	dCT	ddCT	2 <sup>^</sup> ddCT
MO14	ALB	30,46	31,08	16,17	16,37	14,71	8,62	0,00
MO14	ALB	31,69		16,57				
MO16	ALB	30,74	31,11	17,56	16,85	14,26	8,17	0,00
MO16	ALB	31,48		16,14				
MO17	ALB	33,73	33,80	19,66	19,63	14,17	8,08	0,00
MO17	ALB	33,87		19,59				
MO24	ALB	33,51	32,90	16,56	17,34	15,56	9,47	0,00
MO24	ALB	32,29		18,12				
RET2	ALB	33,39	34,31	18,37	18,51	15,80	9,71	0,00
RET2	ALB	35,23		18,65				
CAROTIDA 1	ALB	34,87	34,32	15,43	15,52	18,80	12,71	0,00
CAROTIDA 1	ALB	33,76		15,61				
CAROTIDA 2	ALB	33,99	33,99	20,05	19,93	14,07	7,98	0,00
CAROTIDA 2	ALB	33,99		19,80				
CAROTIDA 3	ALB	35,20	35,20	15,24	15,29	19,91	13,82	0,00
CAROTIDA 3	ALB	35,20		15,34				
FASCIA 1	ALB	33,74	34,54	15,29	15,39	19,15	13,06	0,00
FASCIA 1	ALB	35,34		15,49				
FASCIA 2	ALB		#DIV/0!	22,45	22,50	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
FASCIA 2	ALB			22,55				
FASCIA 3	ALB	31,36	31,89	18,52	18,44	13,46	7,37	0,01
FASCIA 3	ALB	32,42		18,35				
FASCIA 5	ALB	30,78	31,07	15,56	15,50	15,57	9,48	0,00
FASCIA 5	ALB	31,36		15,44				
FIGADO 2	ALB	35,37	34,76	21,02	21,35	13,42	7,33	0,01
FIGADO 2	ALB	34,15		21,67				
FIGADO 3	ALB	33,67	33,43	15,85	15,94	17,49	11,40	0,00
FIGADO 3	ALB	33,18		16,03				
FIGADO 4	ALB	32,97	32,97	15,63	15,66	17,31	11,22	0,00
FIGADO 4	ALB	32,96		15,69				
FIGADO 5	ALB	31,97	32,55	15,62	15,64	16,91	10,82	0,00
FIGADO 5	ALB	33,12		15,66				
FIGADO 6	ALB	28,86	29,44	15,94	16,37	13,08	6,99	0,01
FIGADO 6	ALB	30,02		16,79				
GONADA 1	ALB	34,16	34,16	17,55	16,85	17,32	11,23	0,00
GONADA 1	ALB	34,16		16,14				
GONADA 4	ALB	33,81	35,08	17,05	17,06	18,02	11,93	0,00
GONADA 4	ALB	36,34		17,06				
GONADA 5	ALB	31,18	31,76	16,57	16,47	15,29	9,20	0,00
GONADA 5	ALB	32,34		16,37				
HEPG2 1	ALB	35,41	35,41	20,81	20,68	14,74	8,65	0,00
HEPG2 1	ALB	35,41		20,54				
CALIBRADOR	ALB	24,10	24,45	18,55	18,36	<b>6,09</b>	0,00	1,00
CALIBRADOR	ALB	24,79		18,16				

