

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

Penteado, F.C.L.<sup>1,2</sup>, Orellana, M.D.<sup>2</sup>, Fontes, A.M.<sup>2</sup>, Kashima, S.<sup>2</sup>, Covas, D.T.<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centro Regional de Hemoterapia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Recebido 08/02/2008 / Aceito 28/04/2008

## RESUMO

Algumas pesquisas realizadas 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 estudo 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 utilizada neste estudo, 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.

## INTRODUÇÃO

O primeiro estudo 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-tronco 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 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 apa-

\*Autor correspondente: Dimas Tadeu Covas - Centro Regional de Hemoterapia - Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, USP - Rua Tenente Catão Roxo 2501 - CEP.: 14052-140 - Ribeirão Preto - SP, - Brasil - Telefone.: (16) 2101-9300 - Fax: (16) 2101-9309 - e-mail: dimas@hemocentro.fmrp.usp.br

rentemente 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, várias pesquisas 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 OSM, dexametasona e ITS<sup>+</sup> *premix* (insulina, transferrina e ácido selenoso) para a maturação celular. Taléns-Visconti et al. (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 (n = 4) 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 íliaca, 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 FACSsort 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 - Escarlate, Von Kossa e submetidas à reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-colágeno tipo II, respectivamente.

### Indução de CTM à diferenciação hepatocítica

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 PBS 1X para retirar todo o SFB do ambiente celular. Em seguida, o meio IMDM contendo 20 ng/mL de EGF e 10 ng/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 20 ng/mL de HGF, 10 ng/mL de FGFb e 0,6 g/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 20 ng/mL de OSM, 1  $\mu$ Mol/L de dexametasona e 50 ng/mL de ITS<sup>+</sup> *premix* foi adicionado. Por até 28 dias as células permaneceram com esse meio de maturação, que foi trocado uma vez a cada três 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 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 2 min. a 50°C e 10 min. a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 95°C durante 15 seg. e 60°C durante 1 min.

*Diferenciação hepatocítica de CTM*

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	puro	266	Pharmingen
KDR	puro	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 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

### 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 60 min. com PBS 1X, acrescido de albumina bovina 1% (v/v) e soro de cabra 10% (v/v). As amostras foram separadamente incubadas com 10 ug/mL dos anticorpos primários anti-ALB humana, anti-

CK18 humana e anti-alfa-fetoproteína (anti-AFP) humana, durante 60 min. Posteriormente foram realizadas incubações com 1 ug/mL dos anticorpos secundários anti-IgG conjugado com FITC (ALB e AFP) ou anti-IgG conjugado com PE (CK18) durante 30 min. O núcleo das células foi corado com DAPI e as lâminas foram posteriormente montadas com Fluouromont 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 2 h. 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 80 min. O gel foi corado com azul brilhante de Comassie durante 16 h, descorado por 4 h 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 0,5 mg/Kg de tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) via intra-peritoneal. O tratamento com a droga foi realizado durante quatro 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 da medula óssea de um doador do sexo masculino diluídas em 100 uL de PBS 1X e o grupo B recebeu apenas 100 uL 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 25 uL continha 1 ug de DNA e 20 pmoles 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 25 uL continha 5 uL do produto da primeira reação e 20 pmoles de cada oligonucleotídeo interno: P5FAISRY (P5'-CAGTGTGAAACGGGAGAAAACAGT-P3') e P3FAMISRY (P5'-GACGAGGTCGATACTTATAATTCCG-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 302 nm.

## 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

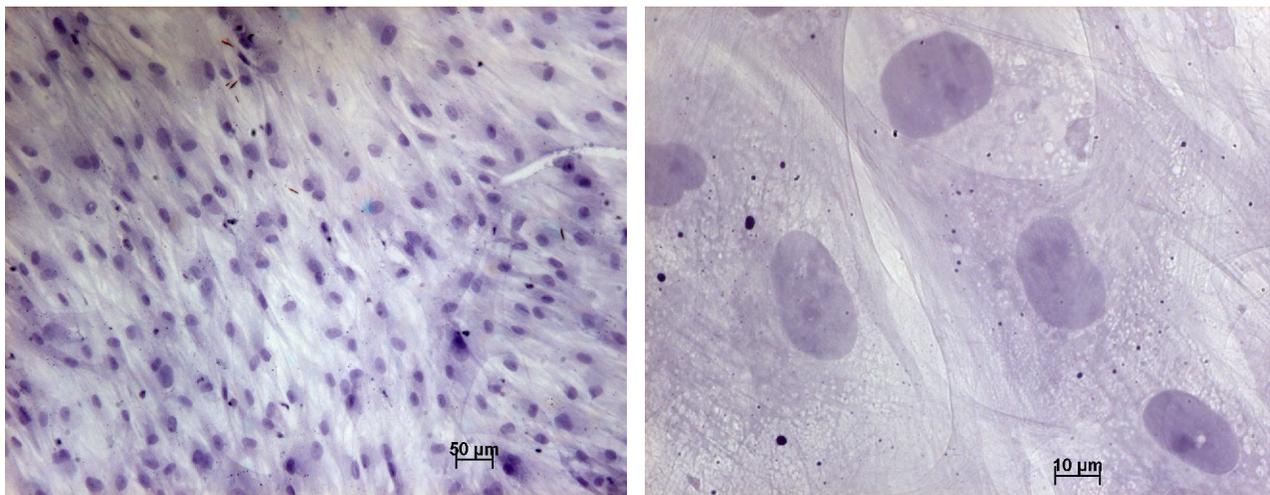


Figura 1. Microfotografia de CTM isoladas da medula óssea humana. A) Células com aproximadamente 90% de confluência coradas com Hematoxilina de Harris, aumento de 40X. B) Aumento de 630X

## Diferenciação hepatocítica de CTM

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

Tabela 3. Porcentagem das células isoladas de quatro amostras de medula óssea (MO) positivas para os respectivos marcadores de superfície celular.

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

MO - Medula Óssea

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 21 dias (D21), porém, esse resultado não se manteve. O marcador CD54 se mostrou aumentado após 28 dias (D28), como mostra a Tabela 4. 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 e as amostras das células no dia zero puderam ser utilizadas como calibrador. Aplicando-se a mediana das amostras em cada tempo (D2, D7, D14, D21 e D28) é possível observar a diminuição 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 três dos principais marcadores hepatocíticos.

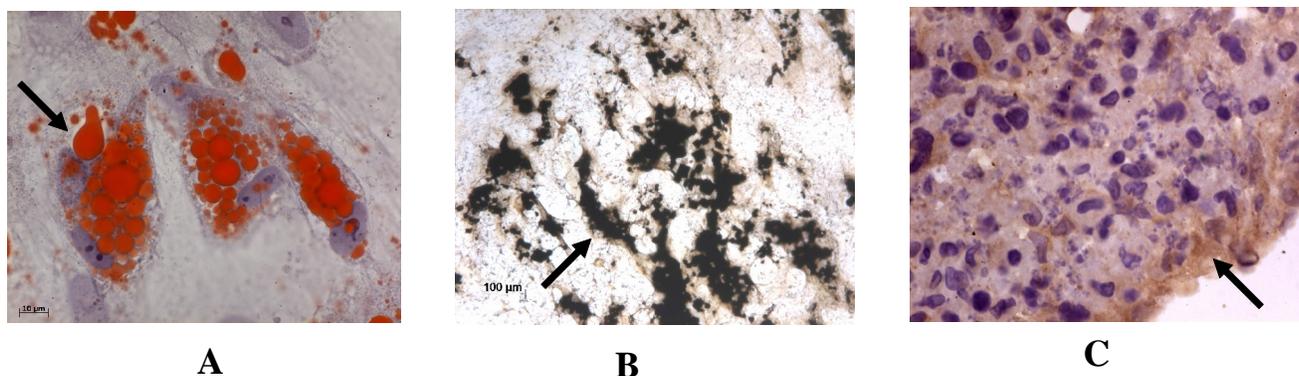


Figura 2. Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação. A) Diferenciação adipogênica: a seta aponta para as gotículas de gordura no citoplasma das células, coloração com Sudan II - Escarlata e Hematoxilina de Harris, aumento de 630X. B) Diferenciação osteogênica: a seta aponta para a deposição de 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.

### Diferenciação hepatocítica de CTM

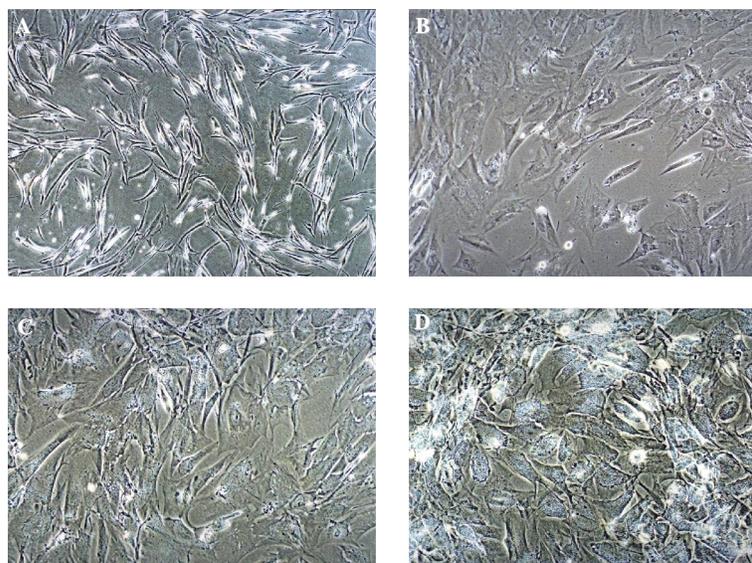


Figura 3. Microfotografia de CTM induzidas à diferenciação hepatocítica, aumento de 100X. A) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 7 dias (D07). B) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 14 dias (D14). C) Células cultivadas em meio de diferenciação durante 21 dias (D21). D)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

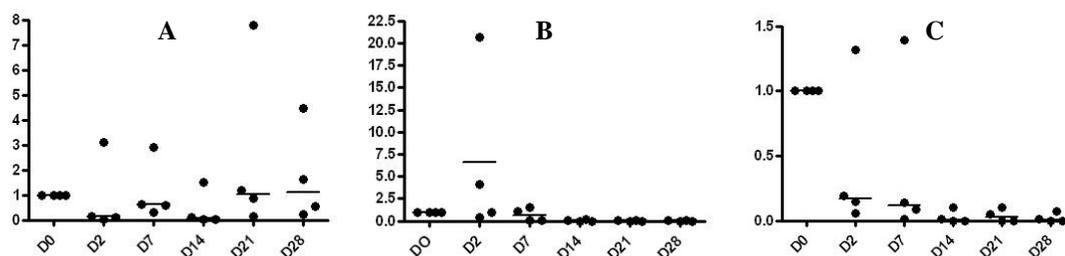


Figura 4. Perfil de expressão dos marcadores hepatocíticos em 4 diferentes amostras de CTM induzidas à diferenciação hepatocítica, nos pontos: dia 0 (D0), dia 2 (D2), dia 7 (D7), dia 14 (D14), dia 21 (D21) e dia 28 (D28), analisadas por RT-PCR em tempo real. (A - Albumina, B - CK-18 e C - CK-19).

Tabela 4: Porcentagem aproximada da expressão dos marcadores imunofenotípicos de CTM isoladas de uma das amostras de medula óssea (MO24) antes e após a indução a diferenciação hepatocítica em diferentes tempos.

Anticorpos	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

MO - Medula Óssea

#### 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 cole-

### Diferenciação hepatocítica de CTM

tado e concentrado. Parte desse sobrenadante foi preparado e aplicado no gel de poliácridamida 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 a 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.

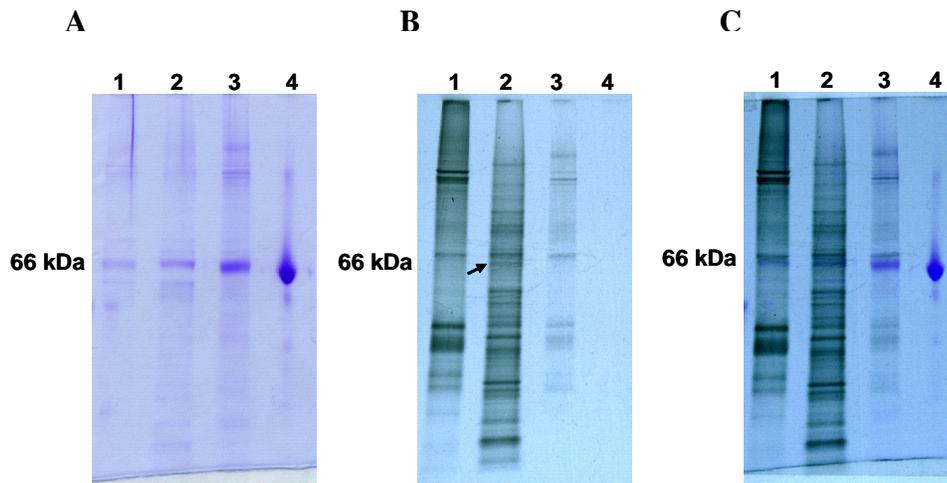


Figura 5. Perfil eletroforético de proteínas totais em gel de poliácridamida 12% (p/v) (SDS-PAGE). Coluna 1: Sobrenadante de células CTM após 14 dias de indução à diferenciação hepatocítica, cultivadas durante 26h em meio sem SFB. Coluna 2: Sobrenadante de células Hep G2 cultivadas durante 26h em meio 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) Auto-radiografia 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.

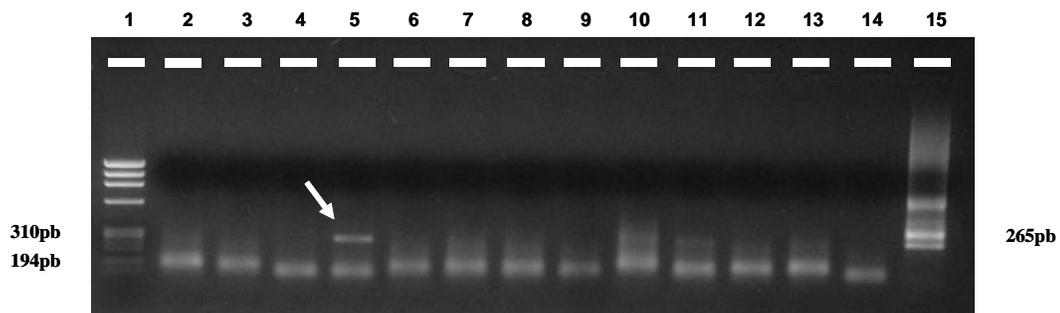


Figura 6. Análise do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). A) Coluna 1: Marcador de peso molecular X. Colunas 2 a 5: Fígado do animal no.1. Colunas 6 a 9: Fígado do animal no.2. Colunas 10 a 13: Fígado do animal no.3. Coluna 14: Fígado do animal no.4. Coluna 15: Sangue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

## 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 protocolo descrito por Lee 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. (2004), 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 (Schirmid 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 (D.T. Covas e colaboradores - dados não publicados) 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 se-

melhante 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.

## ABSTRACT

*Hepatocytic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells*

**Some recent articles have reported that mesenchymal stem cells (MSCs) can be induced to express hepatocyte markers by transplanting them into animal models of liver damage, or by *in vitro* culture with growth factors and cytokines. In this study, the aim is to evaluate the behavior of MSCs subjected to induction of hepatocyte differentiation. The MSCs were isolated from the bone marrow of 4 normal donors, characterized and subjected to both *in vitro* and *in vivo* induction of hepatocyte differentiation. The *in vitro* induced cells showed morphological changes, acquiring hepatocyte-like features. However, the immunophenotype of these cells was not modified. The induced cells exhibited no increase in albumin, cytokeratin 18 or cytokeratin 19 transcripts, when analyzed by real-time RT-PCR. The expression of albumin, cytokeratin 18 and alpha fetoprotein was also unchanged, according to immunofluorescence tests. *In vivo*, the MSC demonstrated a potential to migrate to damaged liver tissue in immunodeficient mice. Taken together, the results suggest that bone marrow MSCs are incapable of *in vitro* differentiation into hepatocytes by the approach used here, but are capable of homing to damaged hepatic tissue *in vivo*, suggesting a role for them**

**in the repair of the liver. This contribution to tissue repair could be associated with a paracrine effect exerted by these cells.**

**Keywords:** mesenchymal stem cells; hepatocyte differentiation; albumin; cytokeratin 18; liver damage; immunodeficient mice.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear 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.
- 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, Mukouyama 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, Sukanuma 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 JA. 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.