

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS A PARTIR DO MEIO
CONDICIONADO DA LINHAGEM HepG2**

CAROLINA URIBE CRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS A PARTIR DO MEIO
CONDICIONADO DA LINHAGEM HepG2**

CAROLINA URIBE CRUZ
Orientador: Ursula Matte

“A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre”.

C957d Cruz, Carolina Uribe

Diferenciação de células tronco mesenquimais a partir do meio condicionado da linhagem HepG2 / Carolina Uribe Cruz ; orient. Ursula Matte. – 2009.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Células-tronco mesenquimais 2. Hepatócitos 3. Linhagem celular tumoral 4. Carcinoma hepatocelular I. Matte, Ursula II. Título.

NLM: WI 735

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO / TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

__08__/_05__/_2009_____

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

PROF. DR. Sandra Maria Gonçalves Vieira

[INSTITUIÇÃO] Hospital De Clínicas De Porto Alegre / Universidade Federal
De Rio Grande Do Sul.

PROF. DR. Lucia Mariano da Rocha Silla

[INSTITUIÇÃO] Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PROF. DR. Themis Reverbel da Silveira

[INSTITUIÇÃO] Hospital De Clínicas De Porto Alegre / Universidade Federal
De Rio Grande Do Sul.

PROF. DR. Jorge Luiz dos Santos

[INSTITUIÇÃO] Hospital de Clínicas de Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os colegas e amigos do GTG, com os quais sempre posso contar para qualquer coisa.

Agradeço aos amigos do laboratório de Hepatologia Experimental, a Flavinha da Patologia.

Um muito obrigada para minha orientadora Ursula Matte, que me guia e me orienta desde há 3 anos.

Muchas Gracias a todos os que contribuíram com este trabalho desinteressadamente.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células-tronco Embrionárias (CTE)	2
1.2 Células-tronco adultas	3
1.2.1 Plasticidade	4
1.2.2 Nicho	5
1.2.3. Células-Tronco Mesenquimais (CTM)	5
1.3 Células-Tronco Mesenquimais e Fígado	11
1.4 Linhagem Celular HEPG2	14
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. ARTIGO SUBMETIDO	18
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	49
7. BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE ABREVIATURAS

2AAF	2-acetaminoflurano
AFP	Alfa-Feto Proteína
ALB	Albumina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMSSC	<i>Bone Marrow Stromal Stem Cells</i>
CCl ₄	Tetracloroeto de Carbono
Cel.	Célula
CFU-F	<i>Colony-Forming Unit Fibroblasts</i>
CK	Citoqueratina
cMet	Receptor do HGF
CO	Células Ovais
CTE	Células-tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
DMEM	<i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
Faah	Fumarilacetoacetato Hidrolase
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G-6-Pase	Glicose-6-fosfatase
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGM	<i>Hepatocyte Growth Medium</i>
HNF-3-β	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 3β</i>
IL1β	Interleucina 1β
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAPC	<i>Multi-Potent Adult Progenitor Cells</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MC-HepG2	Meio Condicionado da linhagem HepG2
MEC	Matriz Extracelular
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NAFLD	<i>Nonalcoholic Fatty Liver Disease</i>
NASH	<i>Nonalcoholic Steatohepatitis</i>
NOD-SCID	<i>Non-Obese Diabetic- Severe Combined Immunodeficiency</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pro-HGF	Precursor biologicamente inerte do HGF
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SPC	<i>Stromal Precursor Cells</i>
SREBP	<i>Sterol Response Element Binding Protein</i>
TAT	Tirosina Aminotransferase
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Mecanismo de divisão assimétrica utilizado pelas células-tronco.	4
Figura 2. Estrutura do nicho onde se encontram as células-tronco.	6
Figura 3. Capacidade de diferenciação das Células-Tronco Mesenquimais	7
Figura 4. Mecanismos propostos para a plasticidade das células-tronco.	8
Figura 5. Coloração Oil Red-O em células HepG2 sem tratamento para indução de esteatose.	47

LISTA DE QUADROS.

Quadro 1: Diferentes protocolos de terapia celular em modelos animais de lesão hepática. 37

Quadro 2: Diferentes denominações para células-tronco mesenquimais encontradas na literatura. 39

RESUMO

OBJETIVO: Examinar o efeito do meio condicionado da linhagem HepG2 nas células-tronco mesenquimais *in vitro* no que se refere à sua diferenciação em hepatócito.

MATERIAIS E MÉTODOS: As CTM foram isoladas da medula óssea de ratas Wistar combinando a centrifugação por gradiente de densidade e a aderência à superfície de cultivo. As CTM foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico e adipogênico e coradas com Alizarin Red S e Oil Red-O respectivamente. Para induzir a diferenciação hepática, CTM foram cultivadas com 70% de meio condicionado de HepG2 ou com 50 ng/mL de fator de crescimento de hepatócito (HGF) durante 3 semanas. Foram realizadas RT-PCR e análises imunocitoquímica para marcadores de células-tronco (Thy-1) e marcadores hepáticos como ALB, AFP, CK-8 e CK-18. Adicionalmente foram realizadas colorações de Oil Red-O em CTM tratadas com meio condicionado de HepG2.

RESULTADOS: Combinando a centrifugação por gradiente de densidade com a aderência à superfície de contacto, isolamos uma população homogênea de CTM nas quais as colorações de Alizarin Red S e Oil Red-O foram positivas quando tratadas. Logo de 3 semanas de tratamento, com meio condicionado de HepG2 ou HGF, não foram observados câmbios morfológicos nem expressão gênica (RT-PCR ou análise imunocitoquímica) para proteínas hepáticas (AFP, ALB, CK8 e CK18). A expressão de Thy-1 foi positivo antes e depois do tratamento em ambos grupos. Surpreendentemente as CTM tratadas com meio condicionado de HepG2 apresentaram acúmulos de lipídeos perinucleares corados com Oil Red-O. Estes acúmulos de gordura foram distintos às observados nas CTM tratadas com meio adipogênico, mas seu fenótipo foi similar às células HepG2 quando coradas com o mesmo método.

CONCLUSÕES: Apesar de que o meio condicionado de HepG2 não foi capaz de induzir a diferenciação de CTM a hepatócitos, ele tem algum efeito sobre as CTM conduzindo a um fenótipo que se assemelha a uma esteatose microgoticular.

SUMMARY

AIM: In the present study, we examined the effect of conditioned medium from the HepG2 cell line upon mesenchymal stem cells and their ability to differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro*.

METHODS: MSCs were isolated from bone marrow of Wistar rats by combining gradient density centrifugation with plastic adherence. The cells were cultured in osteogenic or adipogenic differentiation medium and analyzed by Alizarin Red S and Oil Red-O staining. To induce hepatic differentiation, MSC were cultured with 70% of HepG2-CM or with 50 ng/mL hepatocyte growth factor (HGF) for 3 weeks. RT-PCR and immunocytochemistry analysis for the stem cell marker Thy-1 and hepatic markers, ALB, AFP, CK-8 and CK-18 were performed. In addition, Oil Red-O and Alizarin Red S staining were also performed in the MSC treated with HepG2-CM.

RESULTS: By combining gradient density centrifugation with plastic adherence, we isolated a homogeneous population of MSC and differentiated them into osteocytes and adipocytes. After 3 weeks of treatment no changes in morphology were observed in either group (HepG-CM or HGF). RT-PCR and antibody staining for hepatic proteins (AFP, ALB, CK8 and CK18) were also negative. Expression of Thy-1, a marker of mesenchymal stem cell was positive both before and after treatment in both groups. Surprisingly MSC treated with HepG2-CM for 3 weeks presented lipid droplets that were stained with Oil Red-O. These droplets were very distinct from the ones observed in MSC treated with adipogenic medium but resembled those seen in HepG2 cells stained by the same method.

CONCLUSIONS: However, HepG2-CM was not able to induce differentiation of MSC in a hepatocyte-like, they had an effect upon MSC leading to a phenotype resembling mild steatosis.

1. INTRODUÇÃO

Apesar de que os transplantes de órgãos representam um grande avanço da medicina e uma possibilidade de cura para muitas doenças, as recentes descobertas sobre a capacidade de regeneração tecidual mediada por células-tronco têm modificado este panorama (Rehen & Paulsen 2007). As células-tronco são uma grande promessa como fonte de material para novas terapias não invasivas para tratar uma variedade de doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças cardíacas e muitas outras (Fox & Strom 2008).

As células-tronco são um tema atual e ainda controverso em muitos aspectos. Nesta introdução, descreveremos suas principais características assim como sua aplicação hoje em dia em terapia celular para doenças hepáticas.

Existem dois tipos de classificação para as células-tronco, os quais não são mutuamente excludentes: um segundo sua capacidade de diferenciação e outro segundo sua origem (Argibay P. 2005). Segundo sua *capacidade*, as células-tronco podem ser classificadas em:

Totipotentes: células capacitadas para produzir todos os tipos celulares que formam o embrião, o feto e o indivíduo adulto, incluindo os anexos embrionários, como a placenta. O zigoto e todas as células das primeiras divisões embrionárias são consideradas totipotentes.

Pluripotentes: células que podem dar origem a todos os tipos celulares que formam o feto e o indivíduo adulto, mas não formam os anexos embrionários. Nesta categoria encontramos as células-tronco embrionárias derivadas da massa interna do blastocisto.

Multipotentes: são células com uma capacidade de diferenciação mais limitada, mas ainda capazes de originar múltiplos tipos de células diferenciadas. Por exemplo, as células-tronco da medula óssea.

Segundo sua *origem*, as células-tronco são classificadas em:

Células-tronco embrionárias: derivam da massa celular interna de um embrião de cinco a sete dias de formação, e são as já mencionadas células pluripotentes.

Células-tronco adultas: designam as células-tronco multipotentes que se encontram na maioria dos órgãos e tecidos, tanto aquelas com maior ou menor plasticidade; apesar do nome, incluem também as células obtidas de fetos, de crianças e de sangue de cordão umbilical e por esse motivo tem sido também chamadas de **células-tronco somáticas**.

1.1 Células-tronco Embrionárias (CTE)

As células-tronco embrionárias (CTE) foram isoladas pela primeira vez da espécie humana por Thomson *et al.* em 1998. Possuem a capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em tecidos das três camadas germinativas. Uma de suas principais características é a formação de teratomas quando transplantadas em roedores imunossuprimidos (Martin 1980, Smith 2001).

No Brasil, em 2005, foi regulamentada a pesquisa com CTE humanas por meio da Lei de Biossegurança (n. 11.105/05). Essa Lei autoriza, em seu artigo quinto, o uso de embriões em pesquisas científicas os quais tenham sido gerados em clínicas de fertilização assistida e congelados há mais de três anos, a partir daquela data, ou aqueles sem qualidade para serem implantados no útero; sendo em qualquer caso necessário o consentimento dos genitores (Rehen & Paulsen 2007).

Apesar da pluripotencialidade das células-tronco embrionárias, as controvérsias legais e morais concernentes ao seu uso para aplicações clínicas e terapêuticas promoveram a busca de outros progenitores celulares de mais fácil obtenção (Tuan *et al.* 2003).

1.2 Células-tronco adultas

A principal função das células-tronco no tecido pós-natal é a de manter a homeostase e regenerar os tecidos nos quais reside (Grove *et al.* 2004; Naveiras & Daley 2006). Para poder se manter como um *pool* de células indiferenciadas e ao mesmo tempo prover células diferenciadas, as células-tronco utilizam um mecanismo de divisão assimétrica, no qual uma célula filha retém as características de célula-tronco e a outra se diferencia e prolifera. Esta é uma habilidade única das células-tronco adultas (Oertel & Shafritz 2008; Banas *et al.* 2007).

Durante o processo de diferenciação se originam os precursores celulares, os quais são células com capacidade de diferenciação intermediária entre uma célula-tronco e uma célula diferenciada. Como estes precursores celulares proliferam antes de se diferenciar, também são chamados de *transit amplifying cells*. Os termos precursores celulares e progenitores celulares geralmente são usados de forma indistinta (Figura 1) (Tropel *et al.* 2004; Raff 2003).

As células-tronco adultas têm sido isoladas, com grande sucesso, de uma grande variedade de tecidos e na maioria dos casos foi comprovado seu potencial de diferenciação. Alguns exemplos são: células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Quesenberry & Levitt 1979), células-tronco neurais (Marchenko & Flanagan 2007), células-tronco do músculo esquelético (Goldring *et al.* 2002), células-tronco mesenquimais (CTM) (Pittenger *et al.* 1999), células-tronco epiteliais (Blanpain *et al.* 2007), células-tronco do cérebro (Gritti *et*

al. 1996), células-tronco do tecido adiposo (Bunnell *et al.* 2008), células-tronco do cordão umbilical (Nakahata & Ogawa 1982), células-tronco do fígado (Alison *et al.* 1996), e células-tronco do pâncreas (Meier *et al.* 2009).

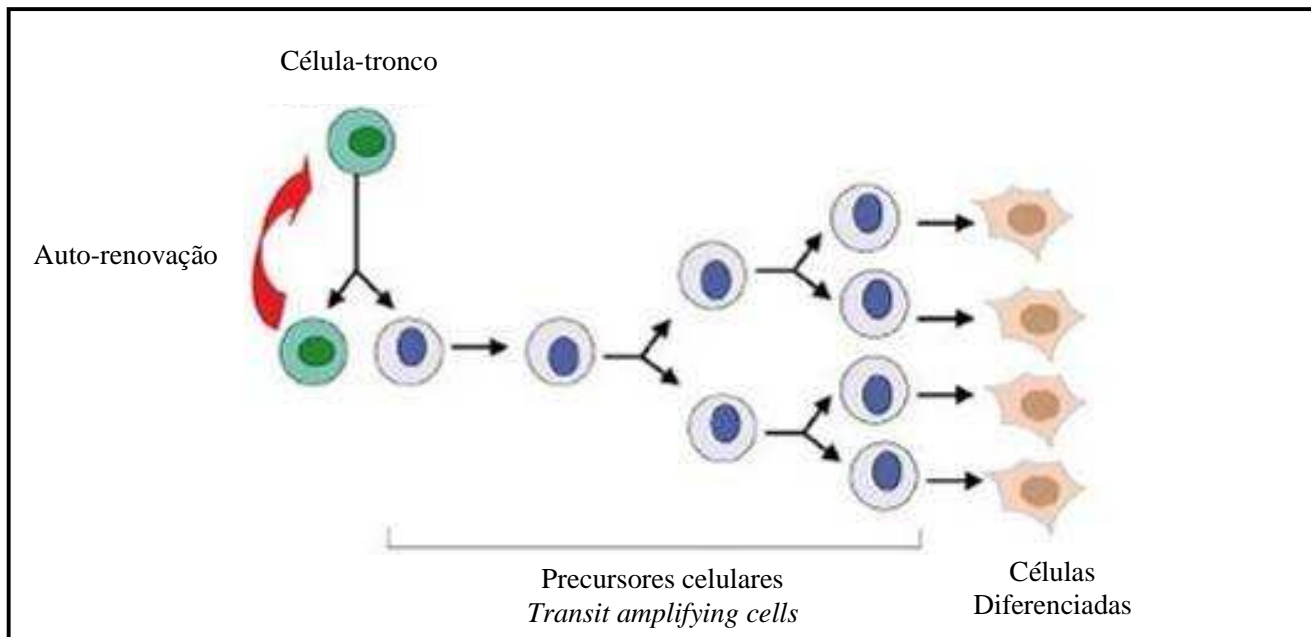


Figura 1. Divisão assimétrica. A célula-tronco pode se auto-renovar ou se comprometer em uma via de diferenciação. Em muitos casos, antes da diferenciação as células-tronco se transformam primeiramente em precursores celulares que proliferam antes de se diferenciar (Adaptado de Raff 2003).

A utilização de células-tronco adultas em terapias apresenta duas vantagens principais: por um lado podem ser isoladas do próprio paciente, evitando-se os problemas da rejeição ao serem transplantadas. A outra vantagem é o menor risco de produzir tumores, o que acontece com maior frequência com as células-tronco embrionárias (Raff 2003).

1.2.1 Plasticidade

As células-tronco adultas, as quais se acreditavam que estavam limitadas a se diferenciar dentro de sua própria linhagem, demonstraram nos últimos anos possuírem a

propriedade de plasticidade. Ainda não há uma definição consensual, mas o termo se refere à habilidade das células para ultrapassar as barreiras de linhagens (referindo-se aos folhetos germinativos), adotando um fenótipo de outro tecido distinto ao de sua origem (Herzog *et al.* 2003).

Assim, por exemplo, células-tronco derivadas da medula óssea são capazes de se diferenciar em células do músculo (Ferrari *et al.* 1998) e em células neurais (Brazelton *et al.* 2000), enquanto células-tronco hematopoiéticas podem se diferenciar em hepatócitos (Lagasse *et al.* 2000) ou células-tronco neurais podem produzir progenitores hematopoiéticos (Bjornson *et al.* 1999).

1.2.2 Nicho

Sabe-se que as células-tronco encontram-se no organismo dentro de seu “nicho”, termo que se refere ao seu micro ambiente onde os principais componentes são as células-tronco, sua progênie, células vizinhas e a membrana basal. Todos esses componentes interagem intimamente através de sinais via matriz extracelular (MEC) ou interação célula-célula, determinando o futuro da célula-tronco. O modelo de nicho prevê que quando uma célula-tronco se divide, só uma célula filha permanece no nicho, enquanto que a outra toma o caminho da diferenciação. Em tecidos com divisões assimétricas, é fácil ver como a saída de uma célula do seu nicho é dirigida pela orientação do fuso mitótico (Figura 2) (Watt & Hogan 2000).

1.2.3. Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

No organismo adulto um dos tipos de células-tronco mais amplamente estudadas são as CTM, as quais foram inicialmente descritas por Alexander Friedenstein durante os

anos 1960 e 1970. São células derivadas da medula óssea que, quando colocadas em cultura em uma concentração adequada (10^4 a 10^5 cels/cm²) apresentam uma morfologia similar à de fibroblastos e cujo crescimento se dá em forma de colônia (Friedenstein *et al.* 1970; Friedenstein *et al.* 1974). Por isso, inicialmente, as CTM foram designadas como *Colony Forming Unit Fibroblast* (CFU-F).

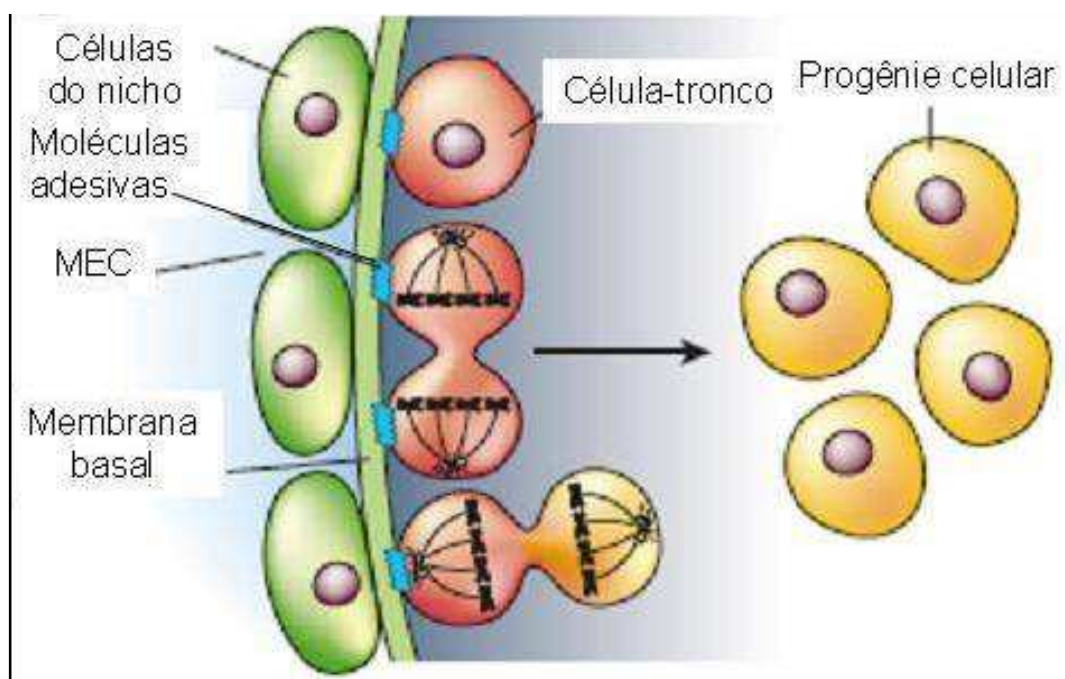


Figura 2. Estrutura de nicho. Células do nicho subjacentes à membrana basal regulam a diferenciação e a divisão das células-tronco. Quando o mecanismo de diferenciação prevalece, a célula-tronco se divide e uma célula filha conserva sua conexão com o nicho enquanto a outra se solta e começa a se diferenciar. Quando prevalece um mecanismo de repopulação, a célula-tronco se divide simetricamente regulada por fatores locais e sinais da matriz extracelular (Adaptado de Spradling *et al.* 2001).

Foi apenas em 1999 que Mark F. Pittenger demonstrou a plasticidade das CTM humanas. Pittenger e colaboradores diferenciaram as CTM em osteócitos, adipócitos e condrócitos por meio de métodos de cultivo fáceis e reprodutíveis (Pittenger *et al.* 1999). Desde os experimentos de Pittenger *et al.* até a atualidade as CTM têm demonstrado sua plasticidade para se diferenciar não só nas três linhagens mesodérmicas típicas (osteócito,

condrócito, adipócito), como também em linhagens endodérmicas e neuroectodérmicas (Figura 3), como, por exemplo, células neurais (Mezey *et al.* 2000), hepatócitos (Petersen *et al.* 1999), células cardíacas (Orlic *et al.* 2001), células do rim (Poulsom *et al.* 2003), etc.

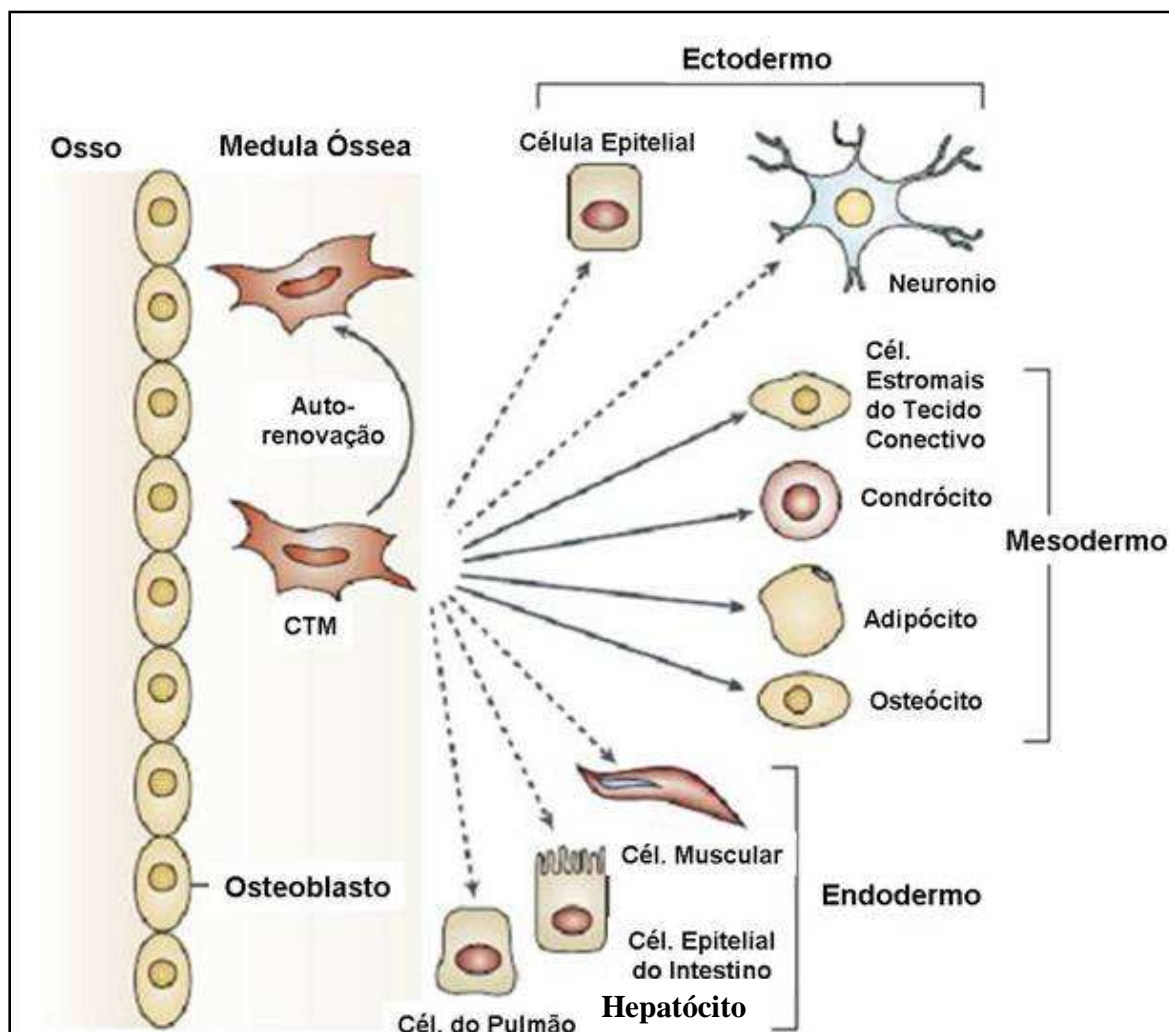


Figura 3. CTM multipotentes. As CTM podem se auto-renovar ou se diferenciar em linhagens mesodérmicas, ectodérmicas e endodérmicas. (Adaptado de Uccelli *et al.* 2007).

Apesar de serem relacionadas sempre à medula óssea, as CTM residem em uma ampla variedade de tecidos, o que foi demonstrado no estudo de da Silva-Meirelles *et al.*

(2006). Neste estudo, células de distintos tecidos (cérebro, baço, fígado, rins, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas) de camundongos adultos apresentavam morfologia, imunofenótipo e propriedades de crescimento similares às CTM derivadas da medula óssea. Mesmo assim, entre todas as fontes de CTM, a medula óssea representa uma opção de fácil acesso, apesar de que nela, as CTM representam apenas uma pequena fração (0.001-0.01%) da população total das células (Pittenger *et al.* 1999).

Vários possíveis mecanismos podem ser especulados sobre a plasticidade das CTM. As teorias mais fortes propõem a transdiferenciação ou fusão celular, não sendo ambos mutuamente excludentes (Herzog *et al.* 2003). O termo transdiferenciação se refere a uma diferenciação irreversível, de uma célula já diferenciada, a outro tipo celular (Vieyra *et al.* 2005). Um mecanismo alternativo para a plasticidade é fusão, onde duas células se unem para gerar um heterocarion, como por exemplo, na fusão de uma célula derivada da medula óssea com uma não-hematopoiética, onde se converte o padrão de expressão gênica da célula da medula ao da outra célula (Herzog *et al.* 2003) (Figura 4).

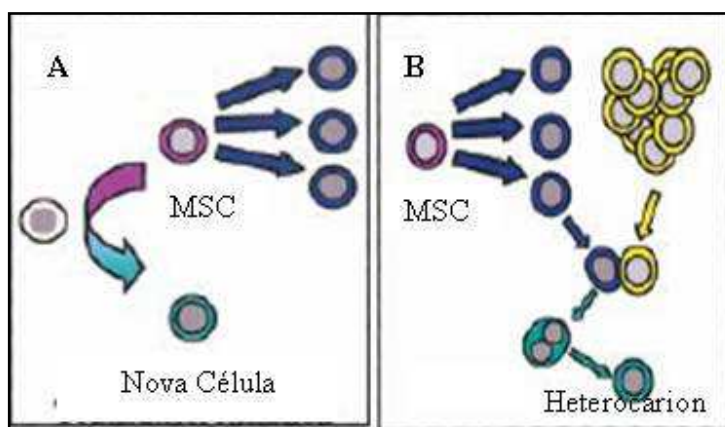


Figura 4. Mecanismos propostos para a plasticidade das células-tronco. **A: Transdiferenciação.** A células-tronco muda seu padrão de expressão gênica para o de um tipo de célula distinta. **B: Fusão.** Neste mecanismo a célula-tronco expressa os genes da outra célula. (Modificado de Herzog *et al.* 2003).

O interesse clínico e biológico nas CTM aumentou muito nas últimas duas décadas, o que gerou muitas ambigüidades e inconsistências tanto na terminologia como nas características que definem uma CTM. No que se refere à terminologia podemos listar vários termos (aqui deixados em inglês para melhor refletir a literatura): *Marrow stromal cells*, *mesenchymal stromal cells*, *colony-forming unit fibroblasts* (CFU-F), *bone marrow stromal stem cells* (BMSSC), *stromal precursor cells* (SPC) e *multi-potent adult progenitor cells* (MAPC) (Baksh *et al.* 2004). Apesar de que nenhum destes termos descreve exatamente a capacidade de diferenciação e desenvolvimento destas células, células-tronco mesenquimais é o termo mais freqüentemente empregado (Chen *et al.* 2008). Quanto às suas características, Dominici *et al.* em 2006 propuseram critérios mínimos para definir CTM, que incluem: aderência à superfície de cultivo, expressão de antígenos de superfície específicos (positivos para CD105, CD73 e CD90, e negativos para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR) e seu potencial de diferenciação, medido através de ensaios funcionais *in vitro*. É importante ressaltar que estes critérios (em especial em relação aos marcadores de superfície) são aplicáveis apenas às CTM humanas. Porém, a capacidade de aderência e de diferenciação são características também de outras espécies como a murina (Dominici *et al.* 2006).

Atualmente a obtenção e manutenção de uma cultura de CTM não apresentam maiores complicações. No caso de seres humanos, as CTM são obtidas geralmente de alíquotas de aspirados da medula óssea da crista ilíaca. Em modelos animais, especificamente roedores, as CTM são obtidas dos ossos da tíbia e do fêmur. Apesar de que os protocolos são variados, a maioria segue mesmo princípio utilizado por Friedenstein e colaboradores (1999) o qual se baseia na propriedade de aderência das CTM ao plástico.

Assim, as CTM são obtidas por plaqueamento direto da medula óssea ou da fração mononuclear (obtida por gradiente de densidade) e remoção da fração não-aderente após certo tempo em cultura. O cultivo de CTM apresenta uma fase inicial de crescimento lento, depois da qual, à medida que o tempo passa e se realizam sucessivos repiques (ou passagens), as células se dividem rapidamente, aumentando sua taxa de crescimento até alcançar valores estáveis, e apresentando-se como uma população homogênea, com uma morfologia *fibroblast-like* (da Silva Meirelles *et al.* 2006). Os sub-cultivos das CTM exibem uma grande variabilidade em seu potencial de expansão. A natureza desta variação pode se dever a vários fatores como, por exemplo, o procedimento de coleta da medula, a baixa frequência de CTM na medula coletada, a idade e condição do doador (Minguell *et al.* 2001).

Essas evidências sugerem que os cultivos de CTM devam ser controlados em relação não só à idade do doador, mas também ao número de passagens com a qual se trabalha. À medida que a idade do doador aumenta, diminui o número de CTM encontradas na fração mononuclear, assim como seu potencial de diferenciação. O mesmo acontece quando o cultivo se encontra em um número elevado de passagens, além de aumentar o risco de aberrações cromossômicas pelo longo tempo em cultura (Tokalov *et al.* 2007).

Devido à sua fácil obtenção, por ser do próprio paciente, as CTM autólogas são uma fonte particularmente promissora de células para muitas aplicações clínicas dentro do campo da medicina regenerativa. As CTM também representam um tipo celular vantajoso para os transplantes alogênicos já que são privilegiadas do ponto de vista do sistema imune, com uma baixa expressão de MHC classe I e sem expressão de MHC classe II, assim os riscos de rejeição do transplante são reduzidos. As CTM também têm uma função

imunossupressora, cujo mecanismo deve envolver a inibição parácrina da proliferação de células T e B. Assim as CTM representam uma população de células com potencial para contribuir em futuros tratamentos para uma ampla variedade de doenças agudas ou degenerativas incluindo as doenças hepáticas (Banas *et al.* 2007).

1.3 Células-Tronco Mesenquimais e Fígado

Uma grande variedade de doenças hepáticas conduz à perda da função do fígado e exige a intervenção médica. Embora nas últimas décadas tenha-se conseguido avanços no manejo clínico dos pacientes com essa síndrome, o único tratamento eficiente ainda é o transplante hepático (Van Thiel e cols., 2001). Atualmente, são relatadas taxas de sobrevida espontânea de cerca de 40%. Com o transplante de fígado tem-se atingido de 80 a 90% de sobrevivência. Contudo, a falta de órgãos disponíveis em tempo hábil dificulta o emprego do transplante como opção terapêutica, e a mortalidade em lista atinge 40% (Polson & Lee, 2005)

Por outro lado, o fato de que o fígado tem uma capacidade de regeneração extraordinária é conhecido há muitos anos. Como conta a mitologia grega, Prometeu, punido por Zeus ficou acorrentado a uma rocha e seu fígado, que era comido diariamente por uma águia, renascia no dia seguinte (Theise & Krause 2002). *In vivo*, existem três fontes distintas de células que participam na regeneração do fígado. A **primeira** fonte são os hepatócitos maduros, os quais respondem rapidamente ao dano hepático e constituem a primeira linha de regeneração (Overturf *et al.* 1997). A **segunda** fonte, a qual é ativada quando ocorre um dano crônico e extenso, em que os hepatócitos maduros não são mais capazes de responder, são as células ovais (CO), denominação utilizada em estudos em

modelos murinos, enquanto que em humanos essas células são chamadas de células progenitoras hepáticas (Roskams *et al.* 2004). As CO estão localizadas nos canais de Herring, próximas aos ductos biliares e podem se diferenciar tanto em hepatócitos quanto em colangiócitos (células do epitélio biliar) (Beltrami *et al.* 2007). Apesar de existirem um grande número de marcadores para estas células, o que facilita seu isolamento, seu número absoluto no fígado normal é extremamente baixo (Banas *et al.* 2007). A **terceira** fonte são as células-tronco originadas de fontes extra-hepáticas como, por exemplo, as da medula óssea ou outros tecidos (Banas *et al.* 2007).

O uso desses tipos celulares poderia ser uma alternativa ao transplante hepático. Por exemplo, o transplante de hepatócitos maduros é um procedimento mais simples e menos invasivo, e de um único doador se podem beneficiar várias pessoas (Kawashita *et al.* 2005). Entretanto, foi demonstrado que menos de 20% a 30% dos hepatócitos transplantados sobrevivem e que múltiplos procedimentos são necessários para se conseguir uma repopulação total do fígado (Rajvanshi *et al.* 1996). Além disso, o procedimento de transplante de hepatócitos está limitado pela escassez de fígados cadavéricos, o limitado potencial de replicação e a perda das características e função hepáticas dessas células em cultura, assim como o reduzido número de células viáveis após criopreservação (Lloyd *et al.* 2003; Fox & Roy-Chowdhury 2004).

Assim, novas fontes exógenas de hepatócitos de alta qualidade poderiam facilitar o desenvolvimento de terapias celulares aplicadas ao tratamento de doenças hepáticas (Fox & Strom 2008). O primeiro foco de investigação para a obtenção de hepatócitos a partir de células-tronco foi a medula óssea. Petersen *et al.* (1999), pioneiro nesta área, transplantou medula óssea de ratos machos em ratas fêmeas (cuja medula havia sido previamente irradiada) tratadas com 2-acetaminoflurano (2AAF) e Tetracloreto de Carbono (CCl₄).

Como resultado os animais irradiados se recuperavam e produziam um pequeno número de células hepáticas derivadas da medula óssea. Ainda não se tem um consenso quanto aos mecanismos envolvidos na diferenciação das células da medula óssea em hepatócitos, sejam eles transdiferenciação ou fusão (Xu & Liu 2008).

Na atualidade existem vários ensaios clínicos realizados que investigam os efeitos de células-tronco derivadas de medula óssea em pacientes com doença hepática (Gaia *et al.* 2006; Gordon *et al.* 2006; Terai *et al.* 2006; Yannaki *et al.* 2006; Mohamadnejad *et al.* 2007). Apesar dos resultados da maioria destes ensaios serem alentadores, deve-se ter cautela já que na sua maioria não tem grupo controle e envolvem um pequeno número de pacientes (Houlihan *et al.* 2008).

Assim, pesquisa básica com células-tronco derivadas da medula óssea segue sendo de grande interesse para entender melhor os mecanismos envolvidos na diferenciação destas em hepatócitos. Protocolos bem definidos e eficientes para obter uma grande quantidade de células hepáticas *in vitro* podem contribuir para elucidar os mecanismos de diferenciação em hepatócitos, além de determinar os sinais e mecanismos moleculares que regulam a patogênese *in vitro*. Uma vantagem adicional é que estes protocolos também podem facilitar a manipulação genética para a transmissão de genes/proteínas recombinantes em terapias de regeneração hepática (Heng *et al.* 2005).

Banas *et al.* (2007) apresenta uma revisão dos principais protocolos de diferenciação hepática, tanto *in vivo* como *in vitro*. Vários deles utilizam fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante (TGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Também faz uma descrição dos marcadores específicos da expressão de genes próprios de

hepatócitos como alfa-feto proteína (AFP), albumina (ALB), citoqueratina 8 (CK 8), citoqueratina 18 (CK 18), etc. Por exemplo, Miyazaki *et al.* (2002) cultivaram CTM em *hepatocyte growth medium* (HGM), um meio que foi desenvolvido para cultivar hepatócitos primários em presença de HGF e EGF durante duas semanas. Eles obtiveram colônias compostas por células poligonais, as quais eram semelhantes a hepatócitos maduros. Também Oh *et al.* (2000) evidenciaram que tratamentos *in vitro* de CTM com HGF, durante 21 dias, produz células *hepatocyte-like* capazes de expressar albumina, CK 8, CK 18 e AFP, os quais são tipicamente expressos em hepatócitos de fígado normal.

Outra via para induzir a diferenciação hepática a partir de células-tronco pode ser por co-cultivo com diferentes tipos celulares tais como células estreladas (Deng *et al.* 2008) ou o co-cultivo com células de fígado fetal como é o estudo de Lange *et al.* (2006). Também é freqüente a utilização de meios condicionados, ou seja, meios de cultura que estiveram em contato com algum tipo celular ou tecido de interesse. Chen *et al.* (2007) tratou CTM murinas com meio condicionado derivado de hepatócitos sem lesão hepática alguma. Eles detectaram níveis protéicos ou de RNA mensageiro de AFP, fator nuclear de hepatócito 3- β (HNF-3- β), CK 19, CK 18, ALB, tirosina aminotransferase (TAT) e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase). Além disto, estes *hepatocyte-like* foram transplantados em ratos com dano hepático e restauraram parcialmente os níveis de albumina sérica e expressaram atividade de transaminases (Chen *et al.* 2007). Um estudo semelhante foi apresentado pelo mesmo grupo, mas utilizando hepatócitos de fígado lesado para produzir o meio condicionado (Zhang *et al.* 2007).

1.4 Linhagem Celular HepG2

As células HepG2 são uma linhagem derivada de hepatocarcinoma humano, de um paciente do sexo masculino, livre de agentes virais hepatotrópicos conhecidos, que expressam uma grande variedade de funções metabólicas específicas do fígado (Javitt 1990). Esta linhagem encontra-se disponível comercialmente e está catalogada sob o número ATCC HB-8065.

As HepG2 expressam diversos marcadores hepáticos típicos, incluindo ALB, AFP, CK8 e CK18 (como mostrado neste estudo) e são usadas freqüentemente como um modelo de cultivo de hepatócitos para estudos metabólicos (Javitt, 1990) e como modelo *in vitro* para os estudos humanos da biotransformação (Wilkening *et al.* 2003).

Neste estudo buscou-se avaliar se o meio condicionado da linhagem HepG2 (MC-HepG2) seria capaz de induzir a diferenciação de células-tronco mesenquimais em hepatócitos, o que poderia representar uma fonte alternativa e de custo relativamente baixo de produção de células hepáticas.

2. JUSTIFICATIVA

A partir do anteriormente exposto, fica demonstrada a capacidade das células-tronco mesenquimais para se diferenciarem em hepatócitos. Entretanto, ainda são necessários protocolos de diferenciação hepática economicamente acessíveis e de fácil aplicação. Hoje em dia estes protocolos apresentam a desvantagem de um alto custo nos fatores de crescimento e demais elementos utilizados como agentes de diferenciação. É por isso que se propõe a utilização de meio condicionado derivado da linhagem HepG2 para a diferenciação de CTM em hepatócitos.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Observar a diferenciação *in vitro* de CTM da medula óssea em hepatócitos, através do uso do meio condicionado da linhagem celular HepG2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o cultivo de células-tronco mesenquimais de medula óssea murina.
- Determinar a expressão de marcadores específicos de CTM avaliando a expressão de Thy-1 por RT-PCR.
- Avaliar o potencial de diferenciação das CTM por meio de protocolos de diferenciação para adipócitos e osteócitos.
- Analisar a diferenciação das CTM tratadas com meio condicionado de HepG2 ou HGF em células *hepatocyte-like* através de imunocitoquímica para AFP, ALB, CK 8, CK 18 por RT-PCR para AFP, ALB e CK 18..
- Avaliar a deposição de lipídeos nas CTM tratadas com meio condicionado de HepG2.

4. ARTIGO SUBMETIDO

**EFFECT OF HEPG2-CONDITIONED MEDIUM UPON RAT MESENCHYMAL
STEM CELLS**

Title**EFFECT OF HEPG2-CONDITIONED MEDIUM UPON RAT MESENCHYMAL STEM CELLS**

Carolina Uribe, Guilherme Baldo, Luise Meurer, Roberto Giugliani, Ursula Matte

Running title: HepG2 conditioned medium on MSC

Authorship

Carolina Uribe, Guilherme Baldo, Roberto Giugliani, Ursula Matte Gene, Therapy Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Carolina Uribe, Roberto Giugliani, Ursula Matte, Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Guilherme Baldo, Post-Graduation Program on Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Luise Meurer, Experimental Pathology Unit, Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Author contributions: Uribe C and Matte U designed and supervised the study; Uribe C performed the experiments; Luise Meurer analyzed histology data; and Uribe C, Matte U, Baldo G and Roberto Giugliani wrote the manuscript.

Supported by: FIPE/HCPA and Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health (UFRGS).

Correspondence to: Dr. Matte Ursula, Therapy Center, Hospital de Clinicas de Porto Alegre. umatte@hcpa.ufrgs.br

Telephone: +55-51-21018838 **Fax:** +55-51-21018011

Abstract

AIM: In the present study, we examined the effect of conditioned medium from the HepG2 cell line upon mesenchymal stem cells *in vitro*.

METHODS: MSCs were isolated from bone marrow of Wistar rats by combining gradient density centrifugation with plastic adherence. The cells were cultured in osteogenic or adipogenic differentiation medium and analyzed by Alizarin Red S and Oil Red-O staining. To induce hepatic differentiation, MSC were cultured with 70% of HepG2-CM or with 50 ng/mL hepatocyte growth factor (HGF) for 3 weeks. RT-PCR and immunocytochemistry analysis for the stem cell marker Thy-1 and hepatic markers, ALB, AFP, CK-8 and CK-18 were performed. In addition, Oil Red-O and Alizarin Red S staining were also performed in the MSC treated with HepG2-CM.

RESULTS: By combining gradient density centrifugation with plastic adherence, we isolated a homogeneous population of MSC and differentiated them into osteocytes and adipocytes. After 3 weeks of treatment no changes in morphology were observed in either group (HepG-CM or HGF). RT-PCR and antibody staining for hepatic proteins (AFP, ALB, CK8 and CK18) were also negative. Expression of Thy-1, a marker of mesenchymal stem cell was positive both before and after treatment in both groups. Surprisingly MSC treated with HepG2-CM for 3 weeks presented lipid droplets that were stained with Oil Red-O. These droplets were very distinct from the ones observed in MSC treated with adipogenic medium but resembled those seen in HepG2 cells stained by the same method.

CONCLUSION: Although, HepG2-CM was not able to induce differentiation of MSC in a hepatocyte-like, they had an effect upon MSC leading to a phenotype resembling mild steatosis.

Key words: Mesenchymal stem cell; HepG2 conditioned medium, hepatic differentiation, steatosis, cell therapy.

INTRODUCTION

A wide variety of liver diseases leads to the impairment of liver function and requires medical intervention. Liver transplantation is the primary treatment for end-stage liver disease, with a 4-year survival rate of 70% or greater for most clinical conditions^[1,2]. Because of the limited number of donors, organ rejection, problems associated with the long-term use of immunosuppressant drugs, and perioperative morbidity and mortality^[3] alternative therapeutic approaches are needed.

The transplant of mature hepatocytes is of special interest, for being a simpler and less invasive procedure than whole organ transplantation^[4]. However, studies have demonstrated that less than 30% of the transplanted hepatocytes survive and that multiple procedures of transplantation are required to obtain a total repopulation of the liver^[5]. Furthermore, the use of hepatocyte transplantation is reduced by the small number of cadaveric donors, the limited replicate potential of these cells, the loss of characteristics and function of hepatocytes in culture, and the reduced number of viable cells after cryopreservation^[6,7].

In this context, the use of bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) is a promising alternative. These cells are readily accessible and have pluripotent characteristics, including the ability to differentiate into hepatocytes when properly stimulated^[8]. Improving suitable conditions for efficiently obtaining and proliferating hepatocyte progenitor cells from MSC is a requisite for their potential therapeutic use^[9,10].

Conditioned medium (that is, culture medium that had been in contact with some type of cell or tissue of interest) is frequently used to induce differentiation towards a specific cell lineage. Several groups have demonstrated the use of such simple and efficient strategy to induce differentiation of stem cells in hepatocytes^[11,12].

In this study we tested an easy and cost-effective method to induce the differentiation of the MSCs into hepatocyte-like cells using conditioned medium from the hepatic cell lineage HepG2.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and long-term culture of Mesenchymal Stem Cells from rat bone marrow

Bone marrow cells were obtained from female Wistar rats 6-10-week-old (n=3). Animals were sacrificed by CO₂ inhalation and femora and tibiae were isolated. Bone marrow was extruded by flushing with Dubelco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG, LGC Biotecnologia, Brazil), supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco/Invitrogen, USA) and 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco/Invitrogen, USA). The cell pellet was resuspended in DMEM-LG medium and mononuclear bone marrow cell fraction was isolated by centrifugation using FICOLL (GE-Healthcare, USA) gradient at 2500 rpm/min for 25 min at the normal temperature. Cells in the Ficoll interface were collected and rinsed twice with PBS^[13]. Cells were seeded on 6-well plates (TPP, Switzerland) at 1x10⁵ cells/cm² and kept at 37°C and 5% CO₂ with standard medium (D-MEM-LG, supplemented with 10% FBS and 1% P/S). After 72 h, non-adherent cells were removed, and the adherent cells were cultured continuously. Cells were harvested by 0.25% trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, USA) when they grew to 90% confluence. Cell differentiation protocols used cells at passage 3.

Induction of multilineage differentiation

To verify the multipotential mesenchymal characteristics, cells at passage 3 were analyzed for osteogenic and adipogenic potential^[14].

Osteogenic differentiation was induced by culturing MSCs for up to 3 weeks in standard medium supplemented with 50 µg/mL ascorbate acid-2-phosphate (Sigma,USA), 10⁻⁸ mol/L dexamethasone (Acros Organics, Belgica) and 10 mmol/L β-glycerophosphate (Sigma,USA). To observe calcium deposition,

cultures were fixed in 10% formalin and stained with Alizarin Red S (Merck, Germany) at room temperature.

To induce adipogenic differentiation, MSC were cultured for up to 2 weeks in standard medium supplemented with 1 $\mu\text{mol/L}$ dexamethasone, 10 $\mu\text{g/mL}$ human insulin (Gibco, USA) and 100 $\mu\text{mol/L}$ indomethacin (Sigma, USA). Adipocytes were easily discerned from the undifferentiated cells by phase-contrast microscopy. To further confirm their identity, cells were fixed in 10% formalin and stained with Oil Red-O (Merck, Germany).

Induction of hepatogenic differentiation of MSCs by Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Hepatic differentiation was performed as described^[15]. MSC were grown on standard medium supplemented with 50 ng/ml of human recombinant HGF (Invitrogen, USA) for up to 3 weeks. To analyze differentiation by immunocytochemistry 7.3 $\times 10^3$ cells/cm² cells were plated on slide covers coated with (3-Aminopropyl) triethoxysilane (Sigma, USA).

Conditioned medium

Human hepatocarcinoma cells (HepG2 cells; ATCC HB-8605) were cultured in standard conditions. Conditioned medium (CM) was collected after 24 hours in culture with cells 70 % confluent, then filtered with a 0.22 μm filter (Millipore) and used fresh.

Induction of hepatogenic differentiation of MSCs by conditioned medium

MSC were cultured in a mixture of HepG2-CM and standard medium (70% and 30% respectively) for 3 weeks. To analyze differentiation by immunocytochemistry 7.3 $\times 10^3$ cells/cm² cells were plated on slide covers coated with (3-Aminopropyl) triethoxysilane. To determine the presence of lipid droplets, cells were fixed in 10% formalin and stained with Oil Red-O.

As a control, MSC were kept for 3 weeks on standard medium at the same conditions as treated MSC.

RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction

RNA was extracted using the RNeasy Mini-kit (Qiagen Alemanha) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using 3 µg of RNA with Oligo(dT)12-18 primer, using SuperScript II Reverse Transcriptase. For the semiquantitative PCR reaction, 2 µL cDNA-template were mixed with 5 µL PCR-buffer, 1,5 mM µl MgCl₂, 10 mMol dNTPs, 20pmol of each primer, and 2U Taq DNA polymerase in a total volume of 50 µL. All reagents were from Invitrogen, USA. PCR was carried using the primers and conditions showed in Supplementary Table 1. Samples were analyzed on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Supp Table 1 – Primers and amplification conditions used to analyze gene expression of MSC induced to differentiate in hepatocytes.

Primer name	Sequence	PCR condition	Fragment length
ALB	Fow:5'-TGGTATGAATATGCAAGAAG-3' Rev:5'-CACTCTTCCCAGGTTTCTTG-3'	42°C; 35 x	350 pb
CK 18	Fow:5'-GGACCTCAGCAAGATCATGGC-3' Rev:5'-CCAGGATCTTACGGGTAGTTG-3'	50°C; 35 x	518 b
AFP	Fow: 5'-CCCACCCTTCCACTTTCCAGA-3' Rev:5'-GCTGGAAGTGCCTTGTCATAC-3'	54°C; 35 x	164 pb
Thy-1	Fow 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG-3' Rev: 5'-CAGCAATGCATCCTGCAC-3'	51°C; 35 x	129 pb
GAPDH	Fow 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG-3' Rev: 5'-CAGCAATGCATCCTGCAC-3'	42°C; 35 x	429 pb

Immunocytochemistry

Cells plated on slide covers were fixed in methanol and then treated for antigenic recovery with citric acid (pH 6) (Quimex, USA). Blocking of the endogenous peroxidase was made with hydrogen peroxide and unspecific reactions were blocked with skimmed milk. Cells were then incubated for 18 h

with primary antibody for cytokeratin (CK) 8 (1:50 dilution), albumin (ALB) (1:200 dilution), alpha-feto protein (AFP), and CK 18 (1:100 dilution) (DakoCytomation, USA). After washing, cells were incubated for 1 h with the secondary antibody and counterstained with Hematoxylin for nuclear staining.

RESULTS

Isolation and culture of mesenchymal stem cells from rat bone marrow

Cells isolated by gradient density centrifugation showed heterogeneity during the first 3 days, with spindle-shaped cells appearing at the bottom of culture plates and many floating round cells. At the third medium change, the floating cells were completely removed from the culture, and the adherent fibroblast-like cells grew as a whirlpool. The primary culture cells reached confluence 10-12 days later, and then cells were sub-cultured at a ratio of 1:3, and reached confluence 8-10 days later.

Induction of multilineage differentiation

In order to examine the differentiation potential of MSCs, these cells were cultured into osteogenic and adipogenic media. In the initial culture, no mineralized cell was detected (data not shown). Three weeks after culturing with osteogenic medium, mineralized cells were found using Alizarin Red S staining. As early as 2 week after treatment with adipogenic medium, triglyceride-containing vesicles were detectable. Fat storing vesicles were observed by phase-contrast light microscopy and stained with Oil Red-O (Figure 1).

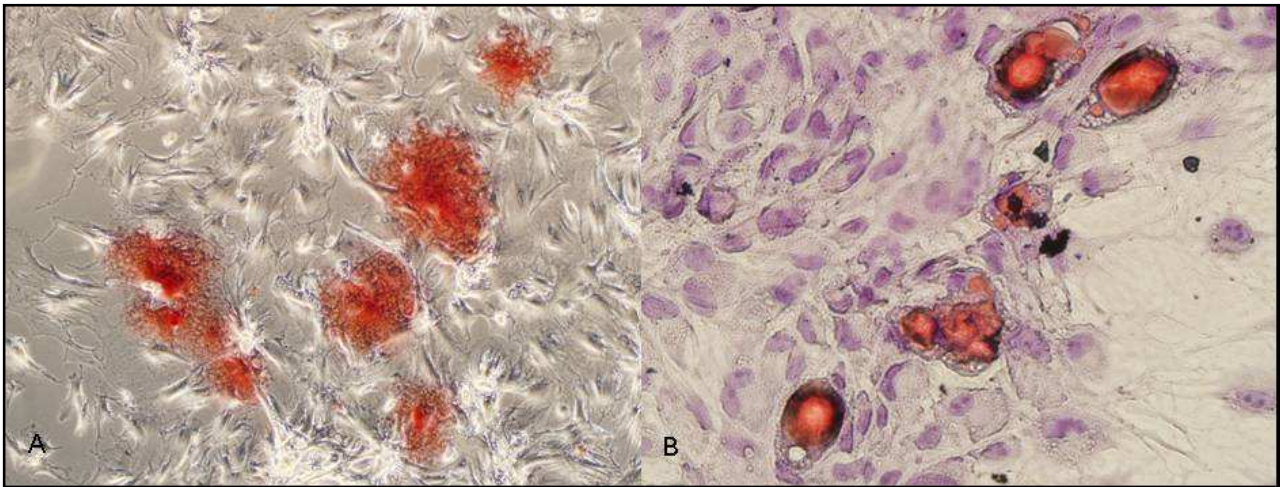


Figure 1 A: MSC treated with osteogenic medium stained with Alizarin Red S; B: MSC treated with adipogenic medium showing lipid droplets on Oil Red-O staining (x 10, x 40).

MSC differentiation into hepatocytes

MSC were induced to differentiate into hepatocytes using HepG2-CM or with 50ng/mL HGF as a positive control. After 3 weeks of treatment no changes in morphology were observed in either group under light microscope. Despite a slight decrease in cell proliferation rate, no overt toxicity was observed.

Antibody staining for hepatocyte specific proteins (AFP, ALB, CK8 and CK18) in MSCs treated with HepG2-CM or HGF was negative (Figure 2). HepG2 cells, used as positive control, stained for these proteins.

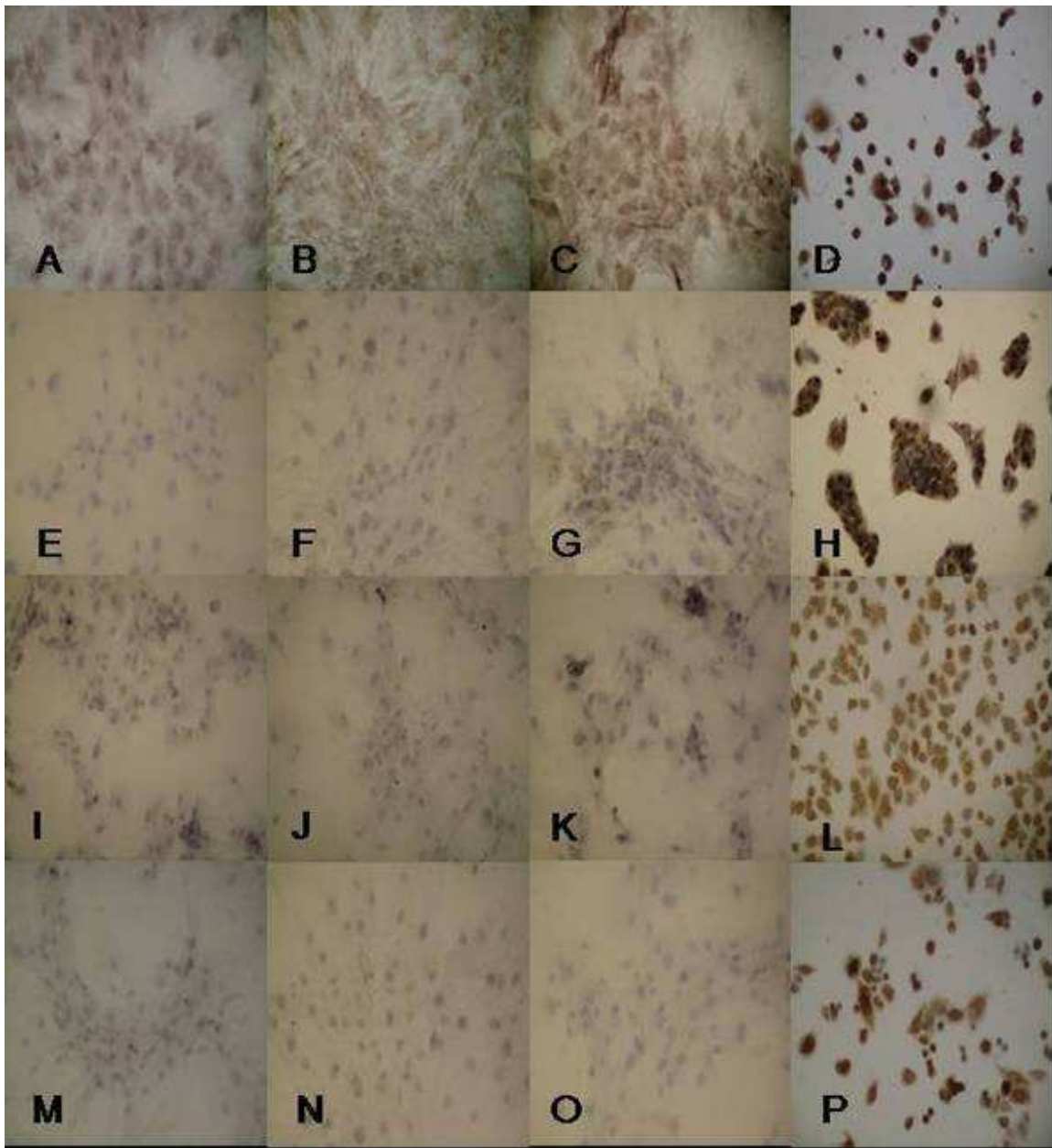


Figure 2 Immunocytochemistry for AFP (A, B, C and D), ALB (E, F, G and H), CK8 (I, J, K and L) and CK18 (M, N, O and P). MSC without treatment A, E, I and M) Both HepG2-CM-treated MSC (B, F, J and N) and HGF-treated MSC (C, G, K and O) for 21 days were negative for hepatocyte markers. HepG2 cells were used as positive controls (D, H, L and P) (x 20).

We then searched for changes in gene expression by reverse transcriptase PCR. MSCs treated with HepG2-CM or HGF showed no expression of hepatocyte specific genes (AFP, ALB, and CK18). Expression of Thy-1, a marker of mesenchymal stem cell was positive both before and after treatment in both groups (Figure 3).

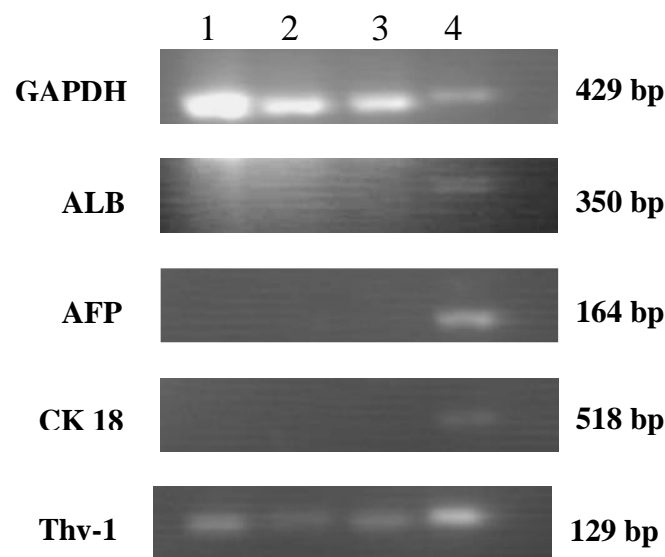


Figure 3 Expression of hepatocyte specific markers (ALB, AFP or CK-18) and Thy-1. MSC cultured on standard conditions (Lane1) and MSC treated with HGF (Lane 2) or HepG2-CM (Lane 3) lack expression of ALB, AFP or CK-18. HepG2 cells (Lane 4) show clear expression of ALB, AFP and CK 18. All cells showed expression of Thy-1 and were positive for GAPDH (internal control).

MSC treated with HepG2-CM for 3 week presented lipid droplets that were stained with Oil Red-O (Figure 4). These droplets were very distinct from the ones observed in MSC treated with adipogenic medium (Figure 1) but resembled those seen in HepG2 cells stained by the same method. Staining of MSC treated with HepG2-CM showed no signs of osteogenic differentiation (data not shown).

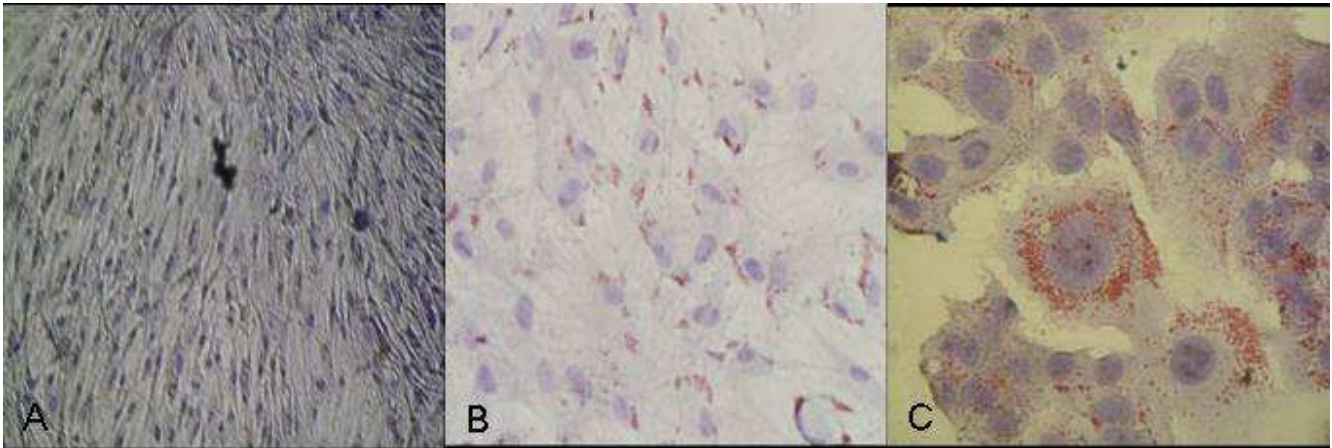


Figure 4 Oil-Red-O staining of MSC and HepG2. A: MSC treated with standard medium; B: MSC treated with HepG2-CM showing lipid droplets, similar to those seen on HepG2 (C). (x 10, x 40, x 40).

DISCUSSION

The search for new sources of hepatocytes is important not only for the need of organs for transplantation but also as tools to study drug metabolism and pathogenic mechanisms *in vitro*^[10]. *In vivo* differentiation of bone marrow stem cell (BMSC) into hepatocytes was first shown by Petersen *et al*^[16] and has even been used in human subjects^[17,18].

Nevertheless, *in vitro* differentiation protocols could have the advantage to facilitate the genetic manipulation of cells for the delivery of recombinant genes/proteins in liver regeneration therapy^[19]. The accomplishment of cytotoxicity/genotoxicity test and pharmacokinetics for biomaterials and drugs developed at present also can be benefited from these new protocols of hepatic differentiation *in vitro*^[10].

It has been reported that MSC have the capacity to differentiate into hepatocytes *in vitro* by induction with growth factors such as hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor (FGF)^[14; 12; 20, 15, 21]. In the present study, we used the combined method of gradient density isolation with plastic adherence to isolate MSC from rat bone marrow. Expression

of Thy-1 (CD90) in cultured MSC and its differentiation into adipocyte and osteocyte showing that the MSC population we used have a potential to differentiate, and fulfill the minimal criteria to be called MSC^[22]. However, when using HGF to induce hepatocyte differentiation in a similar way to that described by Wang *et al.*^[15], our results were negative, suggesting that HGF is not sufficient to induce hepatic differentiation of MSC. This result is coincident with the work of Lange *et al.*^[23] that also cultivated MSCs with growth factors (FGF and HGF) without obtaining any type of differentiation.

The use of conditioned medium (culture medium that has been in contact with some type of cell or tissue of interest) has also been reported to induce hepatic differentiation into MSC. Chen *et al.*^[24] cultivated murine MSC with conditioned medium derived from normal hepatocytes and detected protein levels or mRNA for AFP, Hepatocyte Nuclear Factor 3- β (HNF-3- β), CK 19, CK 18, ALB, tyrosine amino-transferase (TAT), and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase). These hepatocyte-like cells were transplanted in rats with hepatic damage that were shown to partially recover serum ALB levels and transaminase activity^[11]. The same group obtained similar results using injured hepatocytes as the source of conditioned medium^[12].000

We hypothesized that HepG2 conditioned medium (HepG2-CM), although not expressing HGF^[25], would trigger some sort of cell differentiation on MSC as it is a human hepatocarcinoma cell line, that expresses several typical hepatic markers, including ALB, AFP CK8 and CK18. HepG2 cell line frequently is used as a model of hepatocyte culture for metabolic studies *in vitro*^[26] and as models for human biotransformation studies^[27]. This cell line has already been used to prepare conditioned medium, which has the capacity to differentiate embryonic stem cell in neural tissue^[28-30], chondrocyte^[31] and osteocyte^[32].

However, on adult MSC HepG2-CM was not able to induce differentiation towards a hepatic phenotype. Surprisingly, though, HepG2-CM led to the accumulation of perinuclear lipid droplets, a phenotype similar to that displayed

by HepG2 cells, resembling a mild steatosis. Therefore we assume that HepG2-CM had an effect upon MSC, probably triggering the expression of genes related to increased lipogenesis, such as the sterol response element binding protein (SREBP)^[33]. The study of the underlying mechanism of HepG2-CM upon MSC may open a new model to study steatosis-related diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this study was provided by Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA (FIPE/HCPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and Post-Graduation Program on Child and Adolescent Health (UFRGS). U.M. is recipient of research scholarship from CNPq (PQ-2).

COMMENTS

Background

The liver is a unique organ in its regenerative potential after damage, nevertheless for some liver diseases medical intervention is necessary, such as liver or hepatocyte transplantation. However the shortage of organ donors makes it necessary the search for alternative sources of hepatocytes. Stem cells, in particular mesenchymal stem cells (MSC), are being considered a good option for this recently.

Research frontiers

Although *in vivo* stem cell therapy is being used with good results for liver regeneration, *in vitro* differentiation protocols have the advantage to give insights into the mechanisms of differentiation, facilitate the genetic manipulation of cells, and may be helpful for cytotoxicity/genotoxicity tests for biomaterials and drugs. However, cost-effective differentiation protocols are still needed and some

controversy still exists as to what are the minimum requirements for differentiation into hepatocytes.

Related publications

Shin *et al.*, 2006

Lange *et al.*, 2005

Chen *et al.*, 2007

Innovations and breakthroughs

MSC have pluripotent characteristics, including the ability to differentiate into hepatocytes when properly stimulated. This study suggests that use of conditioned medium from HepG2 in culture of MSC not able to induce differentiation towards a hepatic phenotype. However conditioned medium from HepG2 seems to trigger the expression of genes related to increased lipogenesis.

Applications

The study of the underlying mechanism of HepG2-CM upon MSC may open a new model to study steatosis-related diseases.

Terminology

Conditioned medium is the culture medium that has been in contact with some type of cell or tissue of interest. The HepG2-CM is the medium that has been in contact with the cell line HepG2

HepG2 is a human cell line from hepatocarcinoma frequently use as tool for studying hepatocytes *in vitro*.

REFERENCES

1. Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134(7):2111-21 [doi:10.1053/j.gastro.2008.03.015](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.015) PMID:18455168
2. Polson J, Lee WM. ASLD position paper: the management of acute liver failure; American Association for the Study of Liver Disease. *Hepatology*. 2005; May;41(5):1179-97 [doi:10.1002/hep.20703](https://doi.org/10.1002/hep.20703) PMID:15841455
3. Ott M, Schmidt HH, Cichon G, Manns MP. Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation. *Cells Tissues Organs*. 2000; 167(2-3):81-7. [doi:10.1159/000016771](https://doi.org/10.1159/000016771) PMID:10971032
4. Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, Ito Y, Kamohara Y, Kanematsu T. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today*. 2005; 35(9):705-10. [doi:10.1007/s00595-005-3024-5](https://doi.org/10.1007/s00595-005-3024-5) PMID:16133662
5. Ito M, Nagata H, Miyakawa S, Fox IJ. Review of hepatocyte transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009; 16(2):97-100. [doi:10.1007/s00534-008-0023-0](https://doi.org/10.1007/s00534-008-0023-0) PMID:19110647
6. Lloyd TD, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank*. 2003; 4(1):3-15. [doi:10.1023/A:1026392216017](https://doi.org/10.1023/A:1026392216017) PMID:15256864
7. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 2004; Jun, 40(6):878-86. [doi:10.1016/S0168-8278\(04\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(04)00155-2) PMID:15158325
8. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; May;109(10):1291-302 [doi:10.1172/JCI15182](https://doi.org/10.1172/JCI15182) PMID:12021244
9. Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 18; 298(1):24-30. [doi:10.1016/S0006-291X\(02\)02340-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02340-9) PMID:12379214
10. Heng B. C, Yu H, Yin Y, Lim S. G, Cao T. Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. *Jornal of Gastroenterolgy and Hepatology* 2005., 20: 975-987. PMID: 15955203
11. Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*. 2007; 1;102(1):52-63 [doi:10.1002/jcb.21275](https://doi.org/10.1002/jcb.21275) PMID:17340623
12. Zhang GR, Dong XJ, Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Pan RL. Differentiation of

- adult mouse mesenchymal stem cells into hepatocytes cultured in a conditioned culture medium of injured hepatocytes. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2007 Aug;15(8):597-600 PMID: 17711630
13. Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, Meurer L, Soares Duarte ME, Giugliani R, Matte U. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*. 2008 May 2;247(1):1-5. [doi:10.1016/j.tox.2008.01.015](https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.01.015) PMID:18336983
 14. Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 14;11(22):3479-84 PMID: 15948259
 15. Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 30;320(3):712-6. [doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.213](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.213) PMID:15240106
 16. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS & Goff JP. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284:1168-1170. [doi:10.1126/science.284.5417.1168](https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1168) PMID:10325227
 17. Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298. [doi:10.1634/stemcells.2005-0542](https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0542) PMID:16778155
 18. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med*. 2007 Oct;10(4):459-66. PMID: 17903050
 19. Theise ND. Liver stem cells: prospects for treatment of inherited and acquired liver diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2003; 3:403-8. [doi:10.1517/14712598.3.3.403](https://doi.org/10.1517/14712598.3.3.403) PMID:12783609
 20. Shi XL, Qiu YD, Wu XY, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, Li L, Ding YT. In vitro differentiation of mouse bone marrow mononuclear cells into hepatocyte-like cells. *Hepatol Res*. 2005 Apr;31(4):223-31 [doi:10.1016/j.hepres.2005.01.011](https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.01.011) PMID:15862781
 21. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*. 2007 Dec;236(12):3228-41. [doi:10.1002/dvdy.21330](https://doi.org/10.1002/dvdy.21330) PMID:17907200
 22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. [doi:10.1080/14653240600855905](https://doi.org/10.1080/14653240600855905) PMID:16923606
 23. Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver

- cells. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 7;11(29):4497-504 PMID: 16052678
24. Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*. 2007 Sep 1; 102(1):52-63 [doi:10.1002/jcb.21275](https://doi.org/10.1002/jcb.21275) PMID:17340623
 25. Kang Y, Nagy JM, Polak JM, Mantalaris A. Proteomic characterisation of the conditioned media produced by the visceral endoderm-like cell lines HepG2 and End2: Towards a defined medium for the osteogenic/chondrogenic differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18, 1 [doi:10.1089/scd.2008.0026](https://doi.org/10.1089/scd.2008.0026) PMID: 18393639
 26. Javitt NB. HepG2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *Faseb J*. 1990; 1; 4(2):161-8. PMID: 2153592
 27. Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*. 2003 Aug;31(8):1035-42 [doi:10.1124/dmd.31.8.1035](https://doi.org/10.1124/dmd.31.8.1035) PMID:12867492
 28. Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Rao R, Stice SL. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells*. 2006 Jan; 24(1): 125-38 [doi:10.1634/stemcells.2004-0150](https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0150) PMID:16100006
 29. John D. Calhoun, Nevin A. Lambert, Maya M. Mitalipova, Scott A. Noggle, Ian Lyons, Brian G. Condie, and Steven L. Sticeg, Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (2003) 191-197. [doi:10.1016/S0006-291X\(03\)00937-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00937-9) PMID:12788087
 30. Thomas C Schulz1, Gail M Palmarini, Scott A Noggle, Deborah A Weiler, Maisam M Mitalipova and Brian G Condie Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci*. 2003 Oct 22;4:27 [doi:10.1186/1471-2202-4-27](https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-27) PMID:14572319 PMCID:272931
 31. Hwang YS, Polak JM, Mantalaris A. In vitro direct chondrogenesis of murine embryonic stem cells by bypassing embryoid body formation. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):971-8. [doi:10.1089/scd.2007.0229](https://doi.org/10.1089/scd.2007.0229) PMID:18564031
 32. Hwang YS, Randle WL, Bielby RC, Polak JM, Mantalaris A. Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with HepG2-conditioned medium and modulation of the embryoid body formation period: application to skeletal tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006 Jun; 12(6): 1381-92 [doi:10.1089/ten.2006.12.1381](https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.1381) PMID:16846337
 33. Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009 Feb;49(2):443-52 [doi:10.1002/hep.22667](https://doi.org/10.1002/hep.22667) PMID:19127516

5. DISCUSSÃO

A diferenciação de células-tronco em hepatócitos *in vitro* tem sido bastante estudada nos últimos anos. O estabelecimento de protocolos neste sentido poderia contribuir para o desenvolvimento de diferentes áreas da hepatologia, desde seu uso como fonte de hepatócitos para transplante, até em modelos de avaliação dos processos metabólicos de drogas (estudos de citotoxicidade e genotoxicidade) passando por estudos específicos de mecanismos hepáticos celulares ainda desconhecidos, especialmente aqueles relacionados com a própria diferenciação (Heng *et al.* 2005; Theise 2003).

Estudos com células-tronco *in vivo* para regeneração hepática têm sido realizados desde 1999, com o estudo pioneiro de Petersen *et al.* Na sua maioria os resultados são satisfatórios desde o ponto de vista terapêutico, apesar de que nos estudos em modelos animais existam uma grande variedade de protocolos, tanto quanto ao tipo de célula tronco utilizada no tratamento quanto ao tipo de dano hepático, conforme mostrado na tabela 1. Apesar disso, ensaios clínicos em seres humanos já são uma realidade e a maioria deles utiliza células de medula óssea (fração mononuclear) (Gaia *et al.*, 2006; Gordon *et al.* 2006; Terai *et al.*, 2006; Yannaki *et al.* 2006; Mohamadnejad *et al.*, 2007). Um exemplo no Brasil é o estudo de Lyra *et al.* (2007), que avaliaram a segurança e a exequibilidade do transplante de medula óssea em pacientes com doença hepática crônica que se encontravam em lista de espera para transplante hepático. Eles transplantaram 10 pacientes com a fração mononuclear da medula óssea e 48hs após a intervenção os pacientes receberam alta sem que fossem observados eventos adversos ou complicações. Apesar de ter sido relatada uma

diminuição nos níveis séricos de bilirrubina e INR (*International normalized ratio*) e aumento nos níveis albumina, estes parâmetros não foram clinicamente significantes.

Quadro 1 – Diferentes protocolos de terapia celular em modelos animais de lesão hepática.

Tipo Celular	Modelo Hepático	Referência
Células de Medula Óssea	CCl ₄	Luk <i>et al.</i> 2005. Okumoto <i>et al.</i> 2006.
	Ligadura de Ducto Biliar	Luck <i>et al.</i> 2005.
	2-AAF	Okumoto <i>et al.</i> 2006.
CTM	CCl ₄	Abdel Aziz <i>et al.</i> 2007.
	CCl ₄ em camundongos NOD-SCID	Kuo <i>et al.</i> 2008.
	Álcool alílico	Sato <i>et al.</i> 2005.
CTH	CCl ₄	Jang <i>et al.</i> 2004.
	Álcool alílico	Sato <i>et al.</i> 2005.
	Camundongos Faah(-/-)	Lagasse <i>et al.</i> 2000.
CTM-derivadas de tecido adiposo	Camundongos <i>nude</i> tratados com CCl ₄	Banas <i>et al.</i> 2009.

CTM – Células-Tronco Mesenquimais; CTH – Célula Tronco Hematopoiética; CCl₄ – Tetracloreto de Carbono; 2AAF – 2-Aminofluorano; NOD-SCID - *Non-Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency*; Faah – Fumarilacetoacetato hidrolase

Entretanto é preciso ressaltar que ainda não há consenso sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação das células-tronco em hepatócitos, o que torna ainda mais

necessária a realização de estudos *in vitro*. As teorias mais aceitas propõem a existência de dois mecanismos não mutuamente excludentes, a transdiferenciação e a fusão celular, (Herzog *et al.* 2003). Apesar de que as células da medula óssea são consideradas uma fonte extra-hepática de células progenitoras, este conceito foi gerado principalmente por estudos *in vivo*. Por exemplo, Lagasse *et al.* (2000) demonstraram que o transplante de células-tronco hematopoiéticas podem restaurar completamente a função hepática em camundongos deficientes para fumarilacetoacetato hidrolase (Faah), sugerindo que hepatócitos podem derivar de células da medula óssea. A fusão celular entre células-tronco da medula óssea e hepatócitos é provavelmente o principal mecanismo de acordo com os estudos de vários pesquisadores, que demonstram *in vivo* o surgimento de novos hepatócitos logo após a infusão de células da medula óssea (Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Camargo *et al.*, 2004; Willenbring *et al.*, 2004; Quintana-Bustamante *et al.*, 2006;). Porém, em 2004, Lee *et al.* relataram a diferenciação de CTM de humano em hepatócitos *in vitro*. Da mesma forma, Jang *et al.* (2004) demonstraram, através de um sistema de co-cultivo *in vitro*, a transdiferenciação de células-tronco hematopoiéticas em hepatócitos sem a ocorrência de fusão. Assim, de acordo com a teoria de transdiferenciação, o fenótipo de uma célula da medula óssea muda para hepatócitos através de câmbios na atividade transcricional de vários genes. Isso poderia ocorrer com células da medula óssea, como as CTM ou outro tipo específico de célula-tronco (Eguchi & Kanematsu 2009).

Entre as células-tronco, as CTM constituem um grupo de fácil obtenção e cultivo, ainda que na literatura exista uma variedade de denominações que se aplicam a este tipo celular, cada uma com seu conjunto mínimo de características (marcadores, técnicas de

separação, etc). Esta diversidade pode ser observada na Tabela 2, em que são listados algumas das denominações utilizadas para este tipo celular.

Quadro 2 – Diferentes denominações para células-tronco mesenquimais encontradas na literatura.(Adaptado de Baksh *et al.*, 2004).

Denominação	Tipo De Célula Identificada	Animal	Referência
<i>Precursors of non-hematopoietic tissue</i>	Células aderentes da medula óssea que incluem células <i>fibroblast-like</i> , células endoteliais e monócitos/macrófagos.	Porco da Índia Camundongo	Friedenstein <i>et al.</i> 1970. Friedenstein <i>et al.</i> 1976.
<i>Colony forming unit-fibroblast (CFU-F)</i>	Colônias de células fibroblásticas com presença ocasional de monócitos/macrófagos.	Humano Camundongo Coelho	Castro <i>et al.</i> 1980. Friedenstein <i>et al.</i> 1982. Mori <i>et al.</i> 1987.
<i>Mesenchymal stem cells (MSCs)</i>	Células definidas por sua seletiva aderência à superfície sólida.	Humano	Caplan 1991.
<i>Marrow stromal cells</i>	Células aderentes da medula óssea que incluem células <i>fibroblast-like</i> , células endoteliais e colônias de monócitos/macrófagos.	Camundongo	Prockop <i>et al.</i> 1997, Mori <i>et al.</i> 1978, Piersma <i>et al.</i> 1985.
<i>Bone marrow stromal [stem] cells BMSSCs and/or Stromal precursors cells (SPCs)</i>	Células não hematopoiéticas de origem mesenquimal apresentando morfologia de fibroblasto.	Camundongo Humano	Dexter & Lajtha <i>et al.</i> 1974. Shi <i>et al.</i> 2002, Bianco <i>et al.</i> 2000.
<i>Multipotent adult progenitor cells (MAPCs)</i>	Células progenitoras derivadas de medula óssea em cultura.	Humano Rato	Reyes <i>et al.</i> 2001. Jiang <i>et al.</i> 2002.

Por isso, devido à falta de um consenso sobre a definição das CTM, que carecem de marcadores específicos únicos, neste estudo seguimos os critérios de Dominici *et al.* (2006) que incluem marcadores de superfície celular, ensaios de diferenciação e aderência à superfície plástica, além do potencial de diferenciação, medido através de ensaios funcionais *in vitro*. Ainda que neste estudo a análise de marcadores tenha se limitado apenas à expressão de CD90, tanto a aderência à superfície como os ensaios de diferenciação com meios osteogênico e adipogênico demonstraram o potencial de diferenciação das células utilizadas, que aparentemente constituíam uma população homogênea. Porém, uma limitação da análise de marcadores por RT-PCR em relação ao uso de citometria de fluxo é justamente a incapacidade de diferenciar populações homogêneas de heterogêneas e nessas últimas estimar o percentual de células que expressam determinado marcador.

Entre os protocolos de diferenciação *in vitro*, dois tipos principais se destacam: o uso de fatores de crescimento e o uso de meio condicionado (MC). O uso de fatores de crescimento representa o padrão áureo dos estudos de diferenciação, pois neste caso cada fator pode ser analisado isoladamente. Entretanto, além de ser uma técnica de alto custo, os protocolos de diferenciação de CTM em hepatócitos com fatores de crescimento não estão totalmente bem estabelecidos. Vários grupos têm utilizado fatores de crescimento, em especial o HGF, isoladamente ou combinado com EGF ou FGF (Wang *et al.* 2004; Kang *et al.* 2005; Banas *et al.* 2007). O uso do HGF se deve ao fato de ser uma proteína intimamente relacionada à proliferação de hepatócitos.

O HGF é uma glicoproteína secretada como um precursor biologicamente inerte de cadeia simples (pro-HGF). Sob condições apropriadas, tais como o dano ao tecido, o pro-HGF é convertido em sua forma bioativa por digestão proteolítica. A ligação do HGF ativo ao seu receptor (cMet) inicia uma cascata de eventos de auto-fosforilação do domínio tirosina kinase do receptor que culmina na translocação da proteína Met ao núcleo. No núcleo ocorre a ativação de múltiplos genes envolvidos em processos de mitogênese, motogênese e morfogênese. Vários estudos têm evidenciado que o HGF, além de estimular a proliferação e morfogênese de hepatócitos maduros, participa na proliferação e diferenciação de células-tronco do fígado (Zarnegar *et al.* 1995, Shanmukhappa *et al.* 2009).

Entretanto em alguns casos os resultados de diferenciação *in vitro* utilizando HGF não são reprodutíveis. Por exemplo, Lange *et al.* (2005) cultivou CTM com os fatores de crescimento SCF (Fator *Stem Cell*), HGF, EGF, e FGF-4 sem obter diferenciação. Estes autores afirmam que o uso de SCF, HGF, EGF e FGF-4 não são suficientes para induzir diferenciação, sugerindo que o uso de meio condicionado seria vantajoso.

Por outro lado podemos definir o meio condicionado como o meio de cultura que ficou em contato com um tipo celular ou tecido de interesse por um certo tempo. A idéia é que as células liberam substâncias para o meio que são então transferidas para o outro tipo celular quando este meio é colocado em contato com as células alvo. Evidentemente, é preciso tomar todas as precauções necessárias para evitar a contaminação da cultura tratada neste processo pela transferência de células viáveis junto com o meio condicionado. Para isso são empregados diferentes protocolos, tais como centrifugação e filtração do meio condicionado ou congelamento do mesmo a -80°C .

A indução da diferenciação por uso de meio condicionado é uma técnica de baixo custo e simples execução. No caso da diferenciação de CTM em hepatócitos, Chen *et al.* (2007) obtiveram resultados positivos a partir do uso do meio condicionado de hepatócitos normais. Em outro estudo do mesmo grupo (Zhang *et al.* 2007), o mesmo efeito foi obtido com meio condicionado de hepatócitos isolados de animais com intoxicação por CCl₄. Ainda existem estudos com meio condicionado de fragmentos de tecido hepático, como o de Lange *et al.* (2005) também com resultados positivos.

No presente estudo, buscamos avaliar um novo método de diferenciação de CTM em hepatócitos a partir do uso de meio condicionado de células HepG2 (MC-HepG2), que poderiam constituir uma alternativa de baixo custo aos protocolos existentes. Como controle positivo utilizamos o HGF para indução da diferenciação, seguindo o protocolo proposto por Wang *et al.* (2004). Este protocolo utiliza HGF por três semanas em uma concentração de 50ng/mL, ainda que na literatura existam estudo usando concentrações menores como 5ng/mL (Oh *et al.* 2000).

Entretanto, nossos resultados avaliados por imunocitoquímica e RT-PCR foram negativos, coincidindo com a observação de Lange *et al.* (2005) e corroborando a idéia de que HGF não é suficiente para induzir a diferenciação hepática de CTM. O protocolo de Wang *et al.* (2004) apresenta mínimas diferenças em relação ao nosso, mas que podem ajudar a elucidar os motivos pelos quais os resultados são discrepantes. Em primeiro lugar, esses autores utilizaram ratos Sprague-Dawley, enquanto nós utilizamos ratos Wistar. Em segundo lugar, a pesar de que a técnica de isolamento celular foi a mesma, a partir de gradiente de centrifugação com Ficoll e após seleção da fração aderente ao plástico, a forma de análise da população celular obtida foi distinta. Enquanto nós fizemos ensaios de diferenciação e PCR para Thy-1 (CD90), Wang *et al.* (2004) fizeram citometria de fluxo e

observaram que 90% das células eram Thy-1+, CD34- e cKit-. Além disso, esses autores observaram que 20% das células eram positivas para cMet, o qual é o receptor do HGF. Em nosso estudo não avaliamos a expressão de cMet nem podemos determinar o percentual de células Thy-1+, já que a técnica utilizada (RT-PCR) não nos permite essa avaliação. Pode ser que na nossa população celular não tivéssemos um número considerável de células Thy-1+, ou, mais importante, expressando cMet, que seria necessário para a atuação do HGF. A partir dessa avaliação podemos sugerir que novos protocolos de diferenciação em hepatócitos sejam baseados na seleção de células que expressem cMet.

Por outro lado, o protocolo de diferenciação com MC-HepG2 também não apresentou resultados positivos. Nossa escolha pelas células HepG2 foi por serem uma linhagem frequentemente utilizada como modelo de cultivo de hepatócito *in vitro* para testes metabólicos (Javitt *et al.* 1990) e estudos humanos de biotransformação (Wilkening *et al.* 2003). São células que derivam de um hepatocarcinoma humano e que expressam vários marcadores hepáticos incluído ALB, AFP CK 8 e CK18. Assim, nossa hipótese foi que o MC-HepG2 poderia disparar algum tipo de estímulo parácrino para induzir a diferenciação de CTM em hepatócito.

Sabemos que este resultado não se deve à falta de expressão de cMet pelas CTM pois as HepG2 não expressam HGF (Kang *et al.* 2008). Este fator de crescimento não é expresso por hepatócitos *in vivo* e sim por células não parenquimatosas do fígado, especialmente as células de Ito (Noji *et al.* 1990). Portanto não é a falta de HGF que impossibilitaria o MC-HepG2 de induzir a diferenciação das CTM, pois outros grupos obtiveram diferenciação de CTM a partir de meio condicionado de hepatócitos (Chen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007). Resta a dúvida do quão efetivo foi o isolamento de hepatócitos nestes estudos ou se havia a contaminação com células não parenquimatosas hepáticas. No

nosso caso, podemos supor que a linhagem celular HepG2 se comporta como hepatócito, mas não contém fatores parácrinos envolvidos na diferenciação hepática.

Vale a pena destacar que a linhagem HepG2 é freqüentemente utilizada para a produção de meios condicionados com objetivos distintos ao nosso. Estes meios condicionados já foram empregados para diferenciar células-tronco embrionárias em tecido neural (John *et al.* 2003; Schulz *et al.* 2003; Shin *et al.* 2006), osteócito (Hwang *et al.* 2006) ou condrócito (Hwang *et al.* 2008). Esses estudos, entretanto, a pesar de demonstrarem a efetividade do uso de MC-HepG2 em induzirem a diferenciação, apresentam uma importante diferença em relação ao presente estudo no que se refere ao tipo de célula utilizado. Sabe-se que as células-tronco embrionárias apresentam um potencial de diferenciação mais amplo que as células-tronco somáticas (Smith 2001).

Por outro lado, o tratamento efetuado com MC-HepG2 sobre as CTM, produziu a formação de pequenas gotas de gordura perinucleares as quais coraram com Oil Red-O. É importante ressaltar que estes acúmulos são bastante distintos dos acúmulos observados nas CTM tratadas com meio adipogênico. Por outro lado, as CTM tratadas com MC-HepG2 apresentam acúmulos semelhantes aos observados nas células GRX desativadas.

As células GRX são uma linhagem celular de células esteladas hepáticas derivadas de um camundongo infectado com *Schistosoma mansoni*. Estas células são utilizadas como modelo de células esteladas ativadas (miofibroblastos) e possuem a característica de mudar seu fenótipo para um estado desativado ou quiescente, no qual acumulam gotas de lipídeos (Guimarães *et al.* 2007).

As células esteladas são um tipo de célula mesenquimais no parênquima hepático e no fígado normal acumulam retinol em depósitos perinucleares (Asahina *et al.* 2009). Quando ativadas estas células perdem as gotas de lipídeos e adquirem um fenótipo

fibroblasto-like (miofibroblasto), semelhante às CTM em cultura. Existem inclusive evidências de que as CTM participam do processo de fibrogênese hepática (Friedman 2008).

Inicialmente imaginamos que o MC-HepG2 estivesse atuando na reversão do fenótipo “ativado” das CTM. Para avaliar esta hipótese, tratamos células GRX com MC-HepG2 nas mesmas condições utilizadas para as CTM (dados não mostrados). Porém depois de duas semanas de tratamento não observamos nenhuma mudança na morfologia das GRX, nem alteração na coloração com Oil Red-O. Não foi possível manter o tratamento por três semanas devido à alta taxa de proliferação das GRX.

Por outro lado, observamos que as células HepG2 apresentam um padrão de coloração com Oil Red-O semelhante ao observado nas CTM tratadas, com um fenótipo que lembra uma esteatose microgoticular. O termo fígado gorduroso (*fatty liver*) identifica o fígado no qual a quantidade de lipídeos é maior que 5% do seu peso úmido. Este fenômeno é geralmente resultado de um desbalanço entre a afluência de ácidos graxos livres, síntese de triglicerídeos e sua excreção. Quando ocorre acúmulo de gordura, os lipídeos são principalmente armazenados no citoplasma como triglicerídeos, conduzindo a esteatose micro- e macro- vesicular (Gómez-Lechon *et al.* 2007). Inicialmente esses achados estavam ligados principalmente a doenças hepáticas alcoólicas. Entretanto, em anos recentes a esteatose tem sido encontrada em ausência do abuso de álcool, o que levou à definição de uma série de desordens hepáticas que vão desde a doença hepática gordurosa não alcoólica (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) até a esteatohepatite não alcoólica (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH). Em todos estes casos, o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos é uma característica da doença (Gómez-Lechon *et al.* 2007).

Na atualidade modelos *in vitro* de esteatose são utilizados para estudar as conseqüências hepatocelulares do acúmulo de lipídeos em células hepáticas de origem humana (Feldstein *et al.* 2003; Donato *et al.* 2006). Estes modelos são linhagens celulares e cultivos de hepatócitos primários tratados com ácidos graxos saturados e monosaturados (Feldstein *et al.* 2003; Donato *et al.* 2006; Malhi *et al.* 2006). Os resultados obtidos nos modelos *in vitro* são altamente correlacionados com as observações *in vivo*. Como conseqüência, modelos celulares hepáticos *in vitro* podem ser muito úteis para auxiliar as pesquisas dos efeitos bioquímicos do acúmulo de gordura no fígado devido ao consumo de álcool, dieta ou obesidade, excluindo outros fatores que poderiam influenciar o comportamento dos hepatócitos. Assim, como já foi mencionado, a linhagem HepG2 é utilizada como modelo de estudo *in vitro* e no caso da esteatose, não é exceção representando uma alternativa ao cultivo primário de hepatócitos humanos (Gómez-Lechon *et al.* 2007).

Os protocolos utilizados para induzir esteatose na linhagem HepG2 geralmente envolvem a adição de esteróides como estrógeno, ciclosporina A, ácido valpróico (McMillian *et al.*, 2001); lectina (Zhang *et al.* 2009) resveratrol (Wang *et al.* 2009) e diversos ácidos graxos (Zhang *et al.* 2007, Gómez-Lechon *et al.* 2007).

Porém, neste estudo, as células HepG2 apresentaram acúmulos de gorduras sem serem submetidas a tratamento nenhum e sendo mantidas em condições normais de cultivo. Joshi-Barve *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2009) ao estabelecerem um modelo de esteatose nas células HepG2 também observaram uma coloração positiva com Oil Red-O nas células não tratadas, ainda que a presença de acúmulo de gordura nestes estudos foi em menor intensidade do que a encontrada no presente estudo. Por outro lado, Chen *et al.* (2007), trataram a linhagem HepG2 com *Low-density lipoprotein* (LDL) e IL1 β (Interleucina 1 β) e

a coloração com Oil Red-O nas células HepG2 foi positiva apenas nas células tratadas. Essas diferenças podem ser observadas na figura 5.

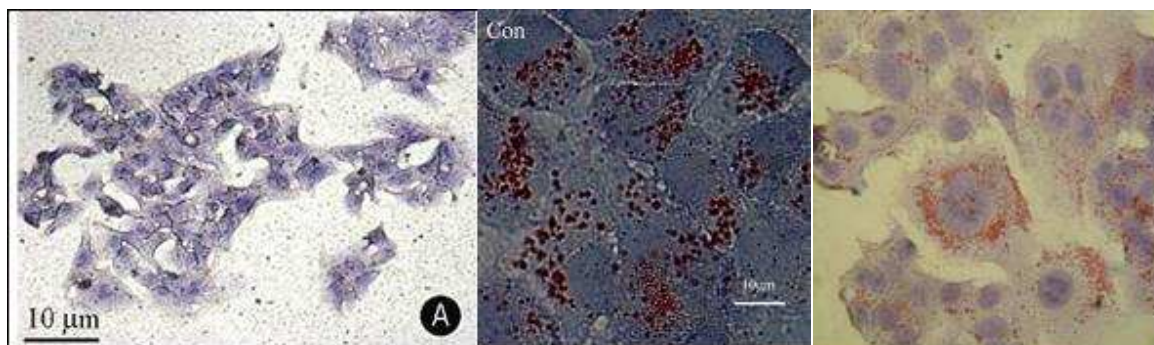


Figura 5. Coloração Oil Red-O em células HepG2 sem tratamento para indução de esteatose. **A:** Chen et al., 2007; **B:** Wang et al. 2009; **C:** Presente estudo. (A e B são reproduções de artigos publicados).

As diferenças na quantidade ou mesmo na presença de gotas de lipídeos encontradas entre estes quatro estudos talvez possam ser devidas ao uso de diferentes meios de cultivo. Chen *et al.* (2007) utilizaram meio DMEM/F12 suplementado com soro de cabra e glutamina, enquanto Joshi-Barve *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2009) utilizaram DMEM suplementado com soro fetal bovino e sem glutamina, da mesma maneira que o presente estudo. Não é possível afirmar com certeza se estas diferenças nas condições de cultivo seriam suficientes para gerar um padrão de coloração distinto ou se as células HepG2 utilizadas no presente estudo se encontravam sob algum tipo de estresse que fez com que o acúmulo de gordura fosse mais evidente. De qualquer forma é importante destacar que as condições de cultivo empregadas neste estudo estão de acordo com as recomendações do *American Type Culture Collection* (ATCC) banco de células do qual foram obtidas (<http://www.atcc.org/>).

Portanto pode-se concluir que o MC-HepG2 parece ter algum efeito sobre as CTM. Assim estas células parecem estar tratando de imitar o fenótipo de HepG2, não expressando marcadores hepáticos, mas sim talvez expressando genes relacionados à lipogênese. Para confirmar essa hipótese é preciso que novos estudos sejam realizados para avaliar se as CTM tratadas com MC-HepG2 se transformaram na realidade em algum tipo de célula que acumula lipídeo que possa ter utilidade no estudo da esteatose. Tais estudos podem incluir a avaliação da expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e colesterol como *sterol response element binding protein* (SREBP) (Passeri *et al.* 2009; Sato 2009), ou receptor de LDL, ou *SREBP cleavage-activating protein* (SCAP). Por outro lado também poderíamos realizar a quantificação de lipídeos como, por exemplo, a determinação por fluorometria com *Nile Red*, um corante vital lipofílico utilizado para marcar gordura no citosol (McMillian *et al.* 2001) e quantificação de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol por ensaios enzimáticos (Gómez-Lechon *et al.* 2007; Chen *et al.* 2007).

Assim, pesar de não havermos alcançado nosso objetivo de diferenciação de CTM em hepatócito através do MC-HepG2, acreditamos que resultados não esperados, como os que obtivemos, nos estimulam a continuar pesquisando os mecanismos subjacentes tanto processo de diferenciação hepática como nos mecanismos próprios das células-tronco e a padronização dos protocolos com os quais se trabalha tanto para diferenciação assim como para a simples manutenção em cultivo de uma linhagem celular.

6. CONCLUSÕES

Foi padronizado o cultivo de células-tronco mesenquimais de medula óssea murina em nosso laboratório, sendo determinada a expressão do marcador específico de CTM Thy-1 por RT-PCR.

O potencial de diferenciação das CTM usando meios adipogênico e osteogênico foi estabelecido através do uso de colorações específicas.

Não foi possível observar a diferenciação das CTM tratadas com MC-HepG2 ou HGF em células *hepatocyte-like* por imunocitoquímica ou RT-PCR para marcadores específicos de hepatócitos, como AFP, ALB, CK 8 e CK 18.

A deposição de lipídeos nas CTM tratadas com MC-HepG2 foi observada pela coloração com Oil Red-O, com um fenótipo que se assemelha a uma esteatose microgoticular.

Ainda que neste estudo não tenha sido possível atingir o objetivo inicial desejado (a diferenciação das CTM em hepatócitos) pudemos observar um efeito do MC-HepG2 sobre essas células.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem.* 2007 Aug; 40(12):893-9.

Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif.* 1996 Jul;29(7):373-402.

Argibay P. Capitulo III. En: *Medicina regenerativa y stem celsl.* De la terapia celular a la ingeniería de tejidos. (Compilado) 1ª edición. Universidad Nacional de Quilmas Editorial Buenos Aires. 2005.

Asahina K, Tsai SY, Li P, Ishii M, Maxson RE Jr, Sucov HM, Tsukamoto H. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology.* 2009 Mar; 49(3):998-1011.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep; 8(3):301-16.

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Jan; 24(1):70-7.

Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn.* 2007 Dec; 236(12): 3228-41.

Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*. 2007 Nov 1; 110(9):3438-46.

Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2000 Jun; 105(12):1663-8.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999 Jan 22; 283(5401):534-7.

Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*. 2007 Feb 9; 128(3):445-58.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000 Dec 1; 290(5497):1775-9.

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun; 45(2):115-20.

Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest*. 2004 May; 113(9):1266-70.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep; 9(5):641-50

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug; 56(2):289-301.

Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem*. 2007 Sep 1;102(1):52-63).

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(5): 815-20.

Chen YX, Ruan XZ, Huang AL, Li Q, Moorhead JF, Varghese Z. Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells induced by inflammatory cytokines. *Chin Med J (Engl)*. 2007 Dec 20;120(24):2185-90

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.

Deng X, Chen YX, Zhang X, Zhang JP, Yin C, Yue HY, Lin Y, Han ZG, Xie WF. Hepatic stellate cells modulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *J Cell Physiol*. 2008 Oct; 217(1):138-44.

Dexter TM, Lajtha LG. Proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Br J Haematol*. 1974 Dec; 28(4):525-30.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

Donato MT, Lahoz A, Jiménez N, Pérez G, Serralta A, Mir J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug Metab Dispos*. 2006 Sep;34(9):1556-62.

Eguchi S, Kanematsu T. What is the real contribution of extrahepatic cells to liver regeneration? *Surg Today*. 2009; 39(1):1-4.

Feldstein AE, Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Bronk SF, Gores GJ. Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice. *J Hepatol.* 2003 Dec; 39(6):978-83.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. Erratum in: *Science* 1998 Aug 14; 281(5379):923.

Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol.* 2004 Jun; 40(6):878-86.

Fox IJ, Strom SC. To be or not to be: generation of hepatocytes from cells outside the liver. *Gastroenterology.* 2008 Mar; 134(3): 878-81.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970 3: 393-403.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974 Apr; 17(4):331-40.

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

Friedenstein AJ, Latsinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol.* 1982 Feb; 10(2):217-27

Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1655-69.

Gaia S, Smedile A, Omede P, et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45:13–19.

Goldring K, Partridge T, Watt D. Muscle stem cells. *J Pathol*. 2002 Jul; 197(4):457-67.

Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007 Jan 30; 165(2):106-16.

Gordon MY, Levicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, et al. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*. 2006 Jul;24(7):1822-30.

Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, et al. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and selfrenew in response to basic fibroblast growth factor. *J. Neurosci*. 1996. 16:1091–100.

Grove J. E, Bruscia E & Krause D. S. 2004. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem cell. *Stem Cell* , 22:487-500.

Guimarães EL, Franceschi MF, Andrade CM, Guaragna RM, Borojevic R, Margis R, Bernard EA, Guma FC. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver Int*. 2007 Nov; 27(9):1255-64.

Heng BC, Yu H, Yin Y, Lim SG, Cao T. Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005 Jul; 20(7): 975-87.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003 Nov 15; 102(10): 3483-93.

Houlihan DD, Newsome PN. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology*. 2008 Aug; 135(2):438-50.

Hwang YS, Polak JM, Mantalaris A. In vitro direct chondrogenesis of murine embryonic stem cells by bypassing embryoid body formation. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct; 17(5):971-8.

Hwang YS, Randle WL, Bielby RC, Polak JM, Mantalaris A. Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with HepG2-conditioned medium and modulation of the embryoid body formation period: application to skeletal tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006 Jun; 12(6):1381-92.

Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*. 2004 Jun; 6(6):532-9.

Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J*. 1990 Feb 1; 4(2):161-8.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4; 418(6893):41-9. Erratum in: *Nature*. 2007 Jun 14; 447(7146):879-80.

John D. Calhoun, Nevin A. Lambert, Maya M. Mitalipova, Scott A. Noggle, Ian Lyons, Brian G. Condie, and Steven L. Sticeg. Differentiation of rhesus embryonic stem cells to neural progenitors and neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (2003) 191–197.

Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology*. 2007 Sep; 46(3):823-30.

Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, Wu SL, Zhao ZY. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 14; 11(22):3479-84.

Kang Y, Nagy JM, Polak JM, Mantalaris A. Proteomic characterisation of the conditioned media produced by the visceral endoderm-like cell lines HepG2 and End2: Towards a defined medium for the osteogenic/chondrogenic differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008 Mar 31.

Kawashita Y, Guha C, Yamanouchi K, Ito Y, Kamohara Y, Kanematsu T. Liver repopulation: a new concept of hepatocyte transplantation. *Surg Today*. 2005; 35(9):705-10.

Ksiazek K. A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. *Rejuvenation Res*. 2009 Apr;12(2):105-16.

Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*. 2008 Jun; 134(7):2111-21, 2121.e1-3.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000 Nov; 6(11):1229-34.

Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. *World J Gastroenterol*. 2005 Aug 7;11(29):4497-504

Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol*. 2006 Apr 21;12(15):2394-7.

Lloyd TD, Orr S, Skett P, Berry DP, Dennison AR. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current methods for banking. *Cell Tissue Bank*. 2003; 4(1):3-15.

Luk JM, Wang PP, Lee CK, Wang JH, Fan ST. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods*. 2005 Oct 20; 305(1):39-47.

Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13:1067–1073.

Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem*. 2006 Apr 28; 281(17):12093-101.

Marchenko S, Flanagan L. Passaging human neural stem cells. *J Vis Exp*. 2007;(7):263.

Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 1980 Aug 15; 209(4458):768-76.

McMillian MK, Grant ER, Zhong Z, Parker JB, Li L, Zivin RA, Burczynski ME, Johnson MD. Nile Red binding to HepG2 cells: an improved assay for in vitro studies of hepatosteatosis. *In Vitro Mol Toxicol*. 2001 Fall; 14(3):177-90.

Meier K, Lehr CM, Daum N. Differentiation potential of human pancreatic stem cells for epithelial- and endothelial-like cell types. *Ann Anat*. 2009; 191(1):70-82.

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000 Dec 1; 290(5497):1779-82.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun; 226(6):507-20.

Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Oct 18; 298(1):24-30.

Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007;10:459–466.

Mori KJ, Fujitake H, Ohkubo H, Ito Y, Dexter TM. Development of stromal cell colonies in bone marrow cell culture. *Gann*. 1978 Oct; 69(5):689-93.

Mori M, Sadahira Y, Awai M. Characteristics of bone marrow fibroblastic colonies (CFU-F) formed in collagen gel. *Exp Hematol*. 1987 Dec; 15(11):1115-20.

Nakahata T, Ogawa M. Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest*. 1982 Dec; 70(6): 1324-8.

Naveiras O, Daley GQ. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Apr;63(7-8):760-6.

Noji S, Tashiro K, Koyama E, Nohno T, Ohyama K, Taniguchi S, Nakamura T. Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat livers, as revealed by in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Nov 30;173(1):42-7

Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Feb;1782(2):61-74.

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 Dec 20; 279(2):500-4.

Okumoto K, Saito T, Haga H, Hattori E, Ishii R, Karasawa T, Suzuki A, Misawa K, Sanjo M, Ito JI, Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol*. 2006 Jan; 41(1):62-9.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5; 410(6829):701-5.

Ott M, Schmidt HH, Cichon G, Manns MP. Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation. *Cells Tissues Organs*. 2000; 167(2-3):81-7.

Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*. 1997 Nov; 151(5):1273-80.

Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*. 2009 Feb; 49(2):443-52.

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*. 1999.284:1168-1170.

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol*. 1985 May; 13(4):237-43.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Polson J, Lee WM. ASLD position paper: the management of acute liver failure; American Association for the Study of Liver Disease. *Hepatology*. 2005 May;41(5):1179-97.

Poulsom R, Alison MR, Cook T, Jeffery R, Ryan E, Forbes SJ, Hunt T, Wyles S & Wright NA. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14:48S-54S.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4; 276(5309):71-4.

Quesenberry P, Levitt L. Hematopoietic stem cells. *N Engl J Med*. 1979 Oct 4;301(14):755-61.

Raff M. ADULT STEM CELL PLASTICITY: Fact or Artifact?. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2003.19:1-22.

Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology*. 1996 Oct; 111(4):1092-1102.

Rehen Stevens, Paulsen Bruna. Capítulo 1. Em: Células-tronco. O que são? Para que servem? Lent R, Viera C. 1ª edição. *Viera & Lent casa editorial*. Rio de Janeiro. 2007.

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2615-25.

Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., et al. 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, 39, 1739–1745.

Sato R. SREBPs: protein interaction and SREBPs. *FEBS J*. 2009 Feb; 276(3):622-7.

Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, *et al*. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005 Jul 15; 106(2):756-63.

Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci*. 2003 Oct 22; 4:27.

Shanmukhappa K, Matte U, Degen JL, Bezerra JA. Plasmin-mediated proteolysis is required for hepatocyte growth factor activation during liver repair. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13.

Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, Wang CY. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol*. 2002 Jun; 20(6):587-91

Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Rao R, Stice SL. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cells*. 2006 Jan; 24(1): 125-38.

Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17:435-62.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98-104.

Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292–2298.

Theise ND, Krause DS. Bone marrow to liver: the blood of Prometheus. *Semin Cell Dev Biol*. 2002 Dec; 13(6):411-7.

Theise ND. Liver stem cells. *Cytotechnology*. 2003 Mar; 41(2-3):139-44.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4;282(5395):1827.

Tokalov SV, Gruener S, Schindler S, Iagunov AS, Baumann M, Abolmaali ND. A number of bone marrow mesenchymal stem cells but neither phenotype nor differentiation capacities changes with age of rats. *Mol Cells*. 2007 Oct 31; 24(2): 255-60.

Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004 May 1;295(2):395-406.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):32-45.

Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007 May; 28(5):219-26.

Van Thiel DH, Brems J, Nadir A, Idilman R, Colantoni A, Holt D, Edelstein S. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2001; 36:1-4.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003 Apr 24; 422(6934):901-4.

Vieyra DS, Jackson KA, Goodell MA. Plasticity and tissue regenerative potential of bone marrow-derived cells. *Stem Cell Rev*. 2005; 1(1):65-9.

Wang GL, Fu YC, Xu WC, Feng YQ, Fang SR, Zhou XH. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 13; 380(3):644-9.

Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, Luk JM. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 30; 320(3):712-6.

Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003 Apr 24; 422(6934):897-901.

Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25; 287(5457):1427-30.

Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*. 2003 Aug; 31(8):1035-42.

Xu YQ, Liu ZC. Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches. *Stem Cell Rev*. 2008 Summer;4(2):101-12.

Yannaki E, Anagnostopoulos A, Kapetanios D, Xagorari A, Iordanidis F, Batsis I, et al. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. *Exp Hematol*. 2006 Nov; 34(11):1583-7.

Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol*. 1995 Jun;129(5):1177-80.

Zhang GR, Dong XJ, Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Pan RL. Differentiation of adult mouse mesenchymal stem cells into hepatocytes cultured in a conditioned culture medium of injured hepatocytes. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2007 Aug;15(8):597-600.

Zhang H, Hu YY, Feng Q. Inhibitory effects of Qushi Huayu Decoction on fatty deposition and tumor necrosis factor alpha secretion in HepG2 cells induced by free fatty acid. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 2007 Dec; 27(12):1105-9.

Zhang Y, Huang C, Sheng X, Gong Z, Zang YQ. Lecithin promotes adipocyte differentiation and hepatic lipid accumulation. *Int J Mol Med*. 2009 Apr; 23(4):449-54.