

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**Diferenciação de células derivadas da medula óssea
em células tipo-hepatócitos**

Laura Simon

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ursula da Silveira Matte

Porto Alegre, Dezembro de 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Terapia Gênica, Unidade de Experimentação Animal e Unidade de Análise Molecular e de Proteínas, sediados no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O trabalho teve apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA - Projeto 12-0208), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX – EDITAL FAPERGS/CNPq n. 008/2009) e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão pelo apoio, incentivo e exemplo.

À Dra. Ursula pela oportunidade, confiança e contribuição na minha formação.

Ao grupo do fígado, pelas discussões científicas e pela colaboração na realização deste trabalho, em especial à Mônica, Carolina, Nelson e Davi.

A todo o grupo do Centro de Terapia Gênica, pela aprendizagem, amizade e momentos de descontração.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal, pela disponibilidade e colaboração decisiva para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo conhecimento adquirido. Ao Elmo, por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos, pelo estímulo, amizade sincera e carinho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. Introdução	10
1.1. Fígado	10
1.2. Doenças hepáticas	11
1.2.1. <i>Insuficiência Hepática Aguda (IHA)</i>	12
1.3. Modelos animais	13
1.3.1. <i>Modelo hepatotóxico por CCl₄</i>	13
1.4. Terapia Celular	14
1.5. Células-Tronco	15
1.5.1. <i>Células-Tronco Adultas</i>	16
1.5.1.1. <i>Células-Tronco Hematopoiéticas</i>	17
1.5.1.2. <i>Células-Tronco Mesenquimais</i>	18
1.6. Fração Mononuclear da Medula óssea	18
1.7. <i>Células tipo-hepatócitos</i>	22
1.7.1. <i>Mecanismos de diferenciação de células tipo-hepatócitos</i>	23
2. Objetivos	25
3. Artigo	27
4. Discussão	59
5. Conclusões	69
6. Referências	70
7. Anexo	81

Lista de abreviaturas

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
Ca²⁺	Cálcio divalente
CCl₃*	Radical Triclorometil
CCl₄	Tetracloroeto de Carbono
CCl₃OO*	Peróxido de Triclorometil
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CT	Célula-Tronco
CTH	Célula-Tronco Hematopoiética
CTM	Célula-Tronco Mesenquimal
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMTi	<i>DNA Methyltransferases inhibitor</i>
FMMO	Fração Mononuclear da Medula Óssea
H1	Histona H1
HDACi	<i>Histone Deacetylases inhibitor</i>
HP1	Proteína de Heterocromatina H1
IHA	Insuficiência Hepática Aguda
iPSc	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
LPS	Lipopolissacarideo
MVs	Microvesículas
RNA	Ácido Ribonucléico

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1:** Principais funções hepáticas.....10
- Figura 2:** Arquitetura hepática normal. Em (A) um desenho do espaço subendotelial com a presença de células estreladas quiescentes (em azul) e células de Kupffer (em roxo); em (B) o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos cercados por epitélio fenestrado.....11
- Figura 3:** Diferenciação de células-tronco pluripotentes em células somáticas especializadas. Células-tronco pluripotentes (no topo) podem se diferenciar em células-tronco adultas (centro) e estas, por sua vez, dar origem às células somáticas de diferentes tecidos (parte inferior).....16
- Figura 4:** Representação das linhagens celulares presentes na medula óssea.....19
- Figura 5:** Microvesículas atuam como mediadoras na reprogramação celular. O tecido lesionado é capaz de atrair células derivadas da medula óssea circulantes e liberar microvesículas que carregam diversos tipos de sinais moleculares, resultando na diferenciação destas células que adquirem um fenótipo semelhante ao das células do tecido lesionado.....24
- Figura 6:** Representação do esquema de co-cultivo e isolamento das MVs. Na câmara superior encontram-se as células da FMMO (fração aderente e não-aderente) co-cultivadas com hepatócitos (câmara inferior) separadas por uma membrana semi-permeável com poros de 0,4 µm. O modelo permite a difusão das MVs derivadas de hepatócitos (em vermelho) e da FMMO (em verde) entre as câmaras.....65

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Painel de moléculas de superfície celular da medula óssea de ratos.....	21
--	----

RESUMO

O uso de células da medula óssea no tratamento da insuficiência hepática aguda é uma alternativa promissora, visto que o único tratamento disponível atualmente é o transplante hepático o qual, devido à falta de órgãos para transplante e complicações pós-cirúrgicas, está associado a uma alta mortalidade. O interesse na identificação de populações celulares capazes de se diferenciar em células tipo-hepatócitos tem ganhado grande atenção, não somente como uma promissora fonte de células para terapia celular de doenças hepáticas, mas também como potencial fonte celular para modelos *in vitro* de testes pré-clínicos de medicamentos, modelos para estudo da hepatogênese, e desenvolvimento de fígados bioartificiais. O presente estudo teve como objetivo identificar a capacidade de diferentes populações de células da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) de se diferenciar em células tipo-hepatócitos. Para isso, utilizamos um sistema de co-cultivo, onde as células da fração aderente e não-aderente da FMMO eram mantidas em contato com o meio de hepatócitos derivados de animais com ou sem lesão por Tetracloreto de Carbono (CCl₄). Nossos resultados mostram que células da fração não-aderente são capazes de adquirir características típicas de hepatócitos após 24 horas de exposição às células do tecido lesionado, tais como expressão gênica de Albumina e Citokeratina-18, e produção e secreção de uréia. Foi identificada a presença de microvesículas carregando material genético específico de hepatócitos no sobrenadante das células diferenciadas, indicando um possível mecanismo molecular na indução da diferenciação. Este trabalho permitiu o estudo da diferenciação celular *in vitro* e análise do papel do microambiente de lesão neste processo.

ABSTRACT

Cell therapy using bone marrow-derived cells is a promising approach for the treatment of acute liver failure, as liver transplant is associated to high mortality due to lack of organs and post-surgical complications. The identification of cell populations capable of generating hepatocyte-like cells has gained immense interest, not only as a promising cell source for cell-based therapy of liver diseases, but also as a potential cell source for *in vitro* models of drug safety testing, models for studying hepatogenesis, and development of bioartificial livers. In the present study, we investigated the capability of different populations from the bone marrow mononuclear cells (BMMC) to differentiate into hepatocyte-like cells. For that, adherent and non-adherent cells from the BMMC were co-cultured with hepatocytes obtained from animals with or without Carbon Tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury. Our results showed that non-adherent BMMC presented signs of differentiation, such as *Albumin* and *Cytokeratin-18* expression and urea production, after 24 hours of co-culture with damaged hepatocytes. Microvesicles carrying hepatocyte-specific genetic material were detected in the supernatant from differentiated cells, thus suggesting a mechanism of differentiation. In summary, this study assessed *in vitro* differentiation of BMMC and analyzed the role of injury micro-environment in cell plasticity.

1. Introdução

1.1. Fígado

O fígado é um órgão essencial à manutenção da vida e da homeostase metabólica corporal. Responsável pelo metabolismo, síntese, armazenamento e redistribuição de nutrientes, carboidratos, gorduras e vitaminas, o fígado produz grandes quantidades de proteínas séricas, incluindo as proteínas de fase aguda, albumina, enzimas e cofatores (**Figura 1**). É o principal órgão de desintoxicação removendo resíduos e xenobióticos por conversão metabólica e através da excreção biliar (Taub, 2004; Vosough et al., 2011).

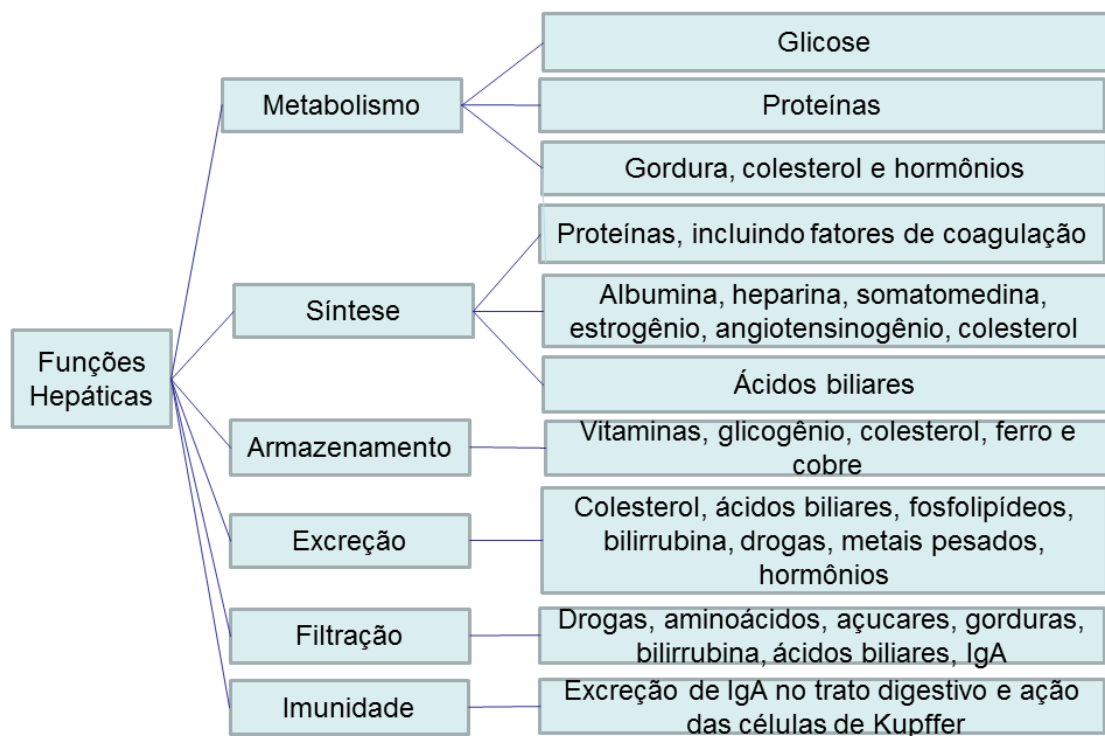


Figura 1. Principais funções hepáticas (Adaptado de Vosough et al., 2011).

O fígado é constituído por diferentes tipos celulares. Os hepatócitos correspondem a 80% dessas células. Os outros 20% da massa hepática são

constituídos por células não-parenquimatosas, que incluem as células endoteliais, as células de Kupffer, os linfócitos e as células estreladas (**Figura 2 A**). As células endoteliais compõem a rede de sinusóides do fígado e fornecem uma grande superfície de absorção dos nutrientes que circulam pela veia porta. As células de Kupffer, também situadas nos sinusóides, são essenciais para a fagocitose de organismos infecciosos e na produção de citocinas. Os linfócitos compõem o sistema imune inato e auxiliam no controle de infecções. As células estreladas possuem várias funções entre elas a de produzir a matriz extracelular e de armazenar vitamina A (Taub, 2004).

O hepatócito é a unidade celular funcional do fígado e realiza múltiplas funções sintéticas e metabólicas. Os hepatócitos são células endoteliais poliploides, altamente diferenciadas, que formam estruturas tipo cordão (**Figura 2 B**). A subunidade funcional do fígado é o lóbulo hepático e é constituída de uma veia central rodeada por 6 tríades portais formadas pelos ductos biliares, pela artéria hepática e pela veia porta (Alison et al., 2009; Duncan et al., 2009).

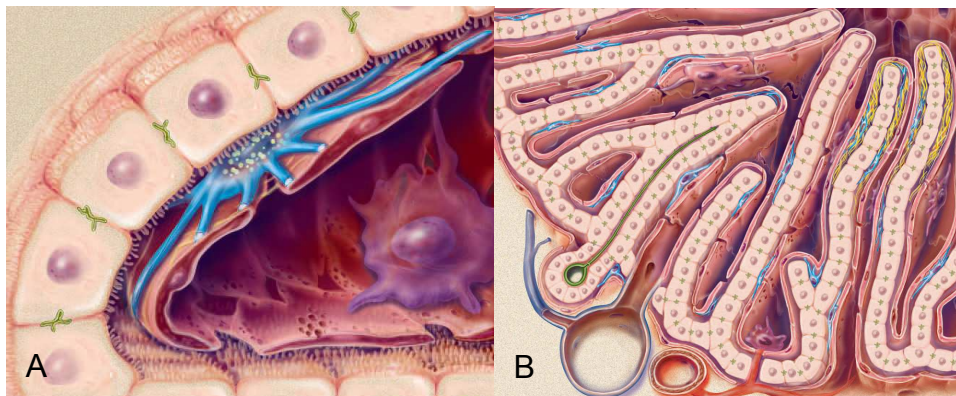


Figura 2. Arquitetura hepática normal. Em (A) um desenho do espaço subendotelial com a presença de células estreladas quiescentes (em azul) e células de Kupffer (em roxo); em (B) o sinusóide hepático e a presença de cordões de hepatócitos cercados por epitélio fenestrado (Friedman & Arthur, 2002).

1.2. Doenças Hepáticas

A imediata resposta regenerativa às injúrias hepáticas é um eficiente mecanismo de manutenção funcional do fígado, da viabilidade do organismo e de preservação da vida (Michalopoulos, 2011). Em vertebrados, o fígado é o único órgão capaz de se regenerar e restituir sua massa primária. Apenas 25% do fígado é necessário para regenerar um órgão completo através da multiplicação dos hepatócitos. Estudos mostram que após a hepatectomia parcial, virtualmente todas as células parenquimatosas do fígado remanescente entram em mitose para restaurar a massa perdida (Vosough et al., 2011). Além dos hepatócitos, estão envolvidas na resposta outras células maduras diferenciadas, como células endoteliais e células do epitélio do ducto biliar. O processo é compensatório, pois o tamanho do fígado resultante é determinado pela demanda do organismo, e, uma vez que a massa original é restabelecida, a proliferação é interrompida (Taub, 2004). No entanto, quando a lesão é muito extensa, a capacidade de regeneração é insuficiente e resulta na doença hepática (Vosough et al., 2011).

1.2.1. Insuficiência Hepática Aguda (IHA)

A insuficiência hepática aguda resulta da perda súbita da função do fígado por necrose aguda do órgão em uma pessoa sem doença hepática pré-existente. As causas, assim como a evolução e o desfecho são variados (Sass & Shakil, 2005; Lee et al., 2008). Nos estados Unidos, a IHA afeta aproximadamente 2000 pessoas por ano (Khan et al., 2006). Diversas são as causas da IHA e as duas principais são as hepatites virais agudas e a hepatotoxicidade decorrente de medicações (Polson & Lee, 2005; Sass & Shakil, 2005; Lee et al., 2008). Em nosso meio, a hepatite viral A é a principal causa de IHA em crianças. Entre 1996 e 2006, de 33 crianças com hepatite fulminante avaliadas pelo Programa de Transplante Hepático Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 13 (39,4%) tinham hepatite A (Ferreira et al., 2008).

Embora nas últimas décadas tenha-se conseguido avanços no manejo clínico dos pacientes, o único tratamento eficiente ainda é o transplante hepático, com o qual a sobrevida atinge 80 a 90%. Contudo, a falta de órgãos disponíveis

faz com que a mortalidade em lista de espera chegue a 40% (Polson & Lee, 2005). É necessário o estabelecimento de um tratamento eficaz que maximize a chance de recuperação do paciente em IHA e apresente alternativa ao transplante hepático, melhorando o prognóstico dos pacientes e evitando o uso desnecessário de órgãos. No entanto, a raridade na ocorrência da síndrome, bem como as variadas etiologias e a diferença na capacidade de recuperação associada à causa, torna inviável a realização de estudos clínicos de grande porte, sendo o manejo dos pacientes baseado em experiências clínicas isoladas (Lee et al., 2012).

1.3. Modelos Animais

Os modelos animais são importantes instrumentos para a ampliação do entendimento da patogênese da insuficiência hepática aguda, da evolução da doença, do manejo das complicações e dos mecanismos envolvidos na regeneração hepática (Berry et al., 2010).

Diferentes drogas podem induzir à lesão hepática por hepatotoxicidade, assim como modelos cirúrgicos de hepatectomia parcial e ligação de ductos biliares (Passos et al., 2010). No modelo farmacológico são utilizadas drogas hepatotóxicas, como o paracetamol, a D-galactosamina, o tetracloreto de carbono (CCl_4), a tioacetamida, a concanavalina A e os lipopolissacarídeos (LPS) (Filipponi & Mosca, 2001).

1.3.1. Modelo hepatotóxico por CCl_4

O uso do CCl_4 como forma de indução de dano hepático está muito bem estabelecido, mostrando-se altamente reprodutível em diversos modelos animais (Weber et al., 2003). A hepatotoxicidade do CCl_4 depende do seu metabolismo pelo complexo enzimático do citocromo P450, presente no retículo endoplasmático dos hepatócitos. A metabolização da molécula de CCl_4 produz o radical triclorometil (CCl_3^*) que reage com importantes constituintes celulares como proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos. Na presença de oxigênio, o radical CCl_3^* é convertido em

peróxido de triclorometil (CCl_3OO^*). Este, por sua vez, apresenta reatividade elevada em relação ao radical CCl_3^* , especialmente na captura de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados, dando início ao processo de peroxidação lipídica. Este processo é caracterizado pela desintegração das moléculas de ácidos graxos poliinsaturados com a formação de outros reativos causadores de danos como alcanos, aldeídos e carbonis. Dessa forma, o dano celular resulta da perda de funcionalidade das membranas celulares, assim como da atividade dos reativos intermediários formados no processo de detoxificação. Outras funções celulares mostram-se danificadas após a intoxicação com CCl_4 , como o bloqueio da metilação do DNA e a habilidade dos hepatócitos de manter os níveis de Ca^{2+} intracelular (Weber et al., 2003).

A extensão da lesão está relacionada à dose utilizada e ao tempo de exposição. Em geral, seis horas após a administração oral do CCl_4 já é possível observar áreas de necrose no fígado. Os locais de necrose atingem extensão máxima entre 24 e 48 horas após a exposição. Além das evidências histológicas, é possível avaliar a lesão hepática através dos níveis séricos das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT), que se mostram elevadas em condições de insuficiência hepática. Em um trabalho desenvolvido inicialmente pelo nosso grupo, foi estabelecido que a indução da IHA em ratos é atingida após 24 horas da administração oral de CCl_4 na dose de 1,25 mg/kg de peso corpóreo. A lesão é confirmada pelo aparecimento de áreas de necrose ao redor de veias centrilobulares, esteatose micro e macrovesicular por todo o parênquima hepático e aumento de três vezes nos níveis séricos de ALT (Baldo et al., 2010).

1.4. Terapia Celular

A terapia através do uso de células tem sido considerada uma alternativa promissora para o tratamento de inúmeras doenças, inclusive a IHA (Belardinelli et al., 2008; Otsuru et al., 2012; Park et al., 2013; Sharma et al., 2013). O uso da terapia celular como meio de estimular a regeneração hepática é uma estratégia que apresenta diversas vantagens sobre o transplante ortotópico, por ser menos invasivo, menos imunogênico, e por permitir o uso, em alguns casos, de células

autólogas (Almeida-Porada et al., 2010). Os tipos celulares mais utilizados na terapia celular para doenças hepáticas são os hepatócitos maduros e as células-tronco adultas. O transplante de hepatócitos, no entanto, apresenta diversas limitações no que diz respeito ao número de células que necessitam expansão prévia ao transplante para que tenha significância clínica, à disponibilidade de tecido hepático para isolamento das células, à funcionalidade das células criopreservadas e à necessidade de imunossupressão do receptor (Kung & Forbes, 2012). A manutenção de culturas primárias de hepatócitos é dificultada pela baixa viabilidade dessas células *in vitro* e pela perda de suas funções celulares, caracterizada como desdiferenciação (Muraca, 2011). As células-tronco adultas, especialmente células derivadas da medula óssea, apresentam características que as tornam ideais para o uso na terapia celular, como fácil obtenção e isolamento, capacidade de proliferação *in vitro* e habilidade de restaurar a função hepática após o transplante (Almeida-Porada et al., 2010).

1.5. Células-Tronco

A definição mais simples de célula-tronco é uma célula com capacidade ilimitada de se dividir para dar origem tanto a uma célula-tronco idêntica quanto a uma célula especializada (Gavaghan, 2001). As células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, de acordo com sua capacidade de diferenciação e origem. As células-tronco totipotentes são capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero, e são as células que compõem o embrião nos primeiros dias após a fertilização. As células pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião e são provenientes da massa interna do blastocisto (**Figura 3**). As multipotentes são células com uma capacidade de diferenciação mais limitada que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares e podem ser encontradas em diferentes estágios do desenvolvimento, inclusive em organismos adultos (Scwindt et al., 2002; Gavaghan, 2001).

As células-tronco podem também ser classificadas de acordo com sua origem e características em células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e,

mais recentemente, células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells; iPS cells*). As células-tronco embrionárias são obtidas a partir do blastocisto no início do desenvolvimento. As células-tronco adultas possuem diversas origens, podendo ser encontradas no cordão umbilical, na placenta e nos órgãos do indivíduo adulto. As células-tronco pluripotentes induzidas possuem propriedades de células-tronco embrionárias, mas são obtidas a partir de células adultas (geralmente fibroblastos) desdiferenciadas a partir de fatores de transcrição específicos envolvidos no desenvolvimento (Shiota & Yasui, 2012).

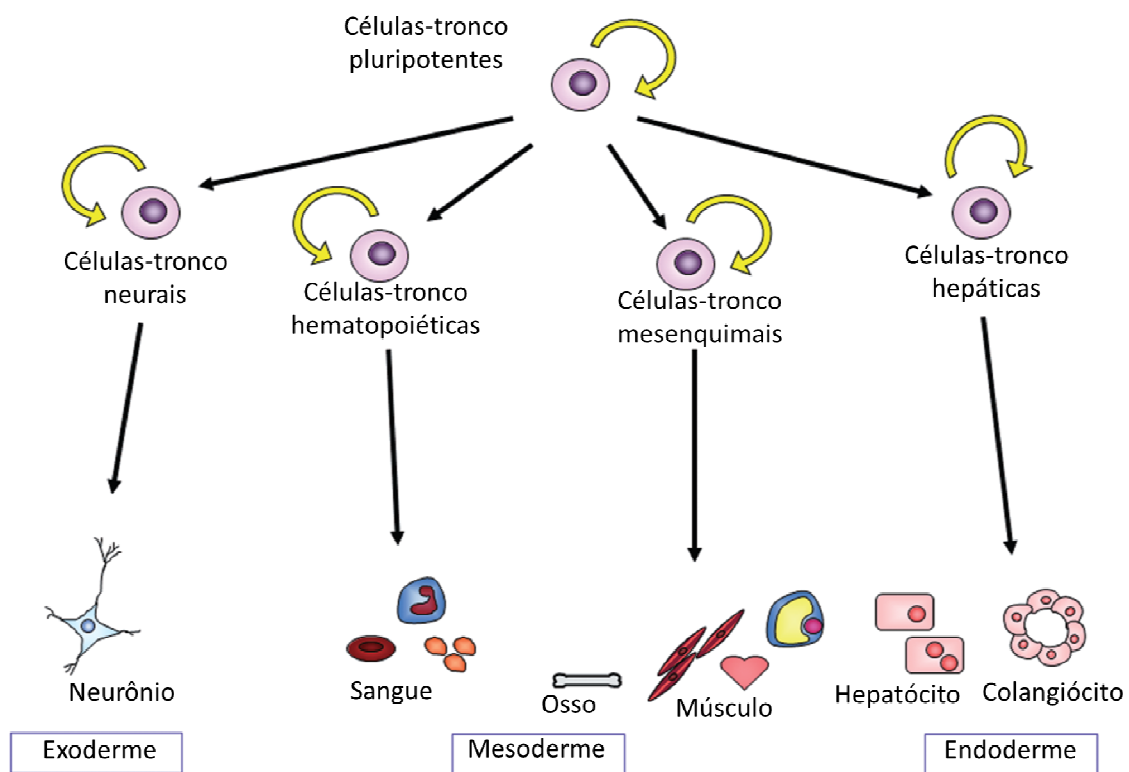


Figura 3. Diferenciação de células-tronco pluripotentes em células somáticas especializadas. Células-tronco pluripotentes (no topo) podem se diferenciar em células-tronco adultas (centro) e estas, por sua vez, dar origem às células somáticas de diferentes tecidos (parte inferior).

1.5.1. Células-Tronco Adultas

As células-tronco adultas, ou células-tronco somáticas, estão presentes na maioria dos tecidos que formam o organismo adulto. Elas controlam a contínua produção de células diferenciadas em tecidos de alta renovação celular, como a mucosa gastrointestinal, a epiderme e o sangue. Também atuam de maneira decisiva em situações de dano, quando auxiliam ativamente o processo de reparo (Ehninger & Trumpp, 2011).

O crescente interesse no potencial regenerativo das células-tronco adultas tem atraído muita atenção e intensificado o esforço da sua utilização na regeneração de órgãos e tecidos. Observações de estudos *in vivo* e *in vitro* têm encorajado sua aplicação e espera-se que as células-tronco adultas tragam grandes benefícios para a medicina regenerativa no tratamento de inúmeras doenças (Turksen, 2013).

Por muito tempo acreditou-se que as células-tronco adultas poderiam somente diferenciar-se em células do mesmo tecido de origem. No entanto, um crescente número de estudos tem sugerido que estas células podem superar a restrição da linhagem germinativa e expressar características moleculares de células de diferentes linhagens, fenômeno que foi denominado plasticidade (Snykers et al., 2006). O conceito de plasticidade é revolucionário na biologia celular, pois extrapola o dogma de que, uma vez que a diferenciação das três linhagens germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme) é estabelecida, é impossível cruzar a barreira entre as linhagens (Muraca, 2011).

Dentre as células-tronco adultas conhecidas até agora, as células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais têm recebido a maior atenção devido à facilidade de obtenção, expansão *in vitro* e plasticidade.

1.5.1.1. Células-Tronco Hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) compreendem uma rara população de células hematopoiéticas e são as células precursoras mais primitivas responsáveis pela manutenção da homeostase sanguínea. Elas residem em nichos hipóxicos na medula óssea, cordão umbilical e, em pequenas quantidades, no sangue periférico. Possuem capacidade ilimitada de divisão

assimétrica, gerando novas células-tronco assim como precursores de diferentes linhagens celulares (Hsu & Qu, 2013). Inicialmente, estudos mostraram a diferenciação das CTH em células sanguíneas adultas, incluindo granulócitos, eritrócitos, linfócitos e megacariócitos/plaquetas. No entanto, a capacidade de diferenciação destas células não está restrita a linhagens hematopoiéticas. Diversos estudos mostram que as CTH derivadas da medula óssea são capazes de gerar diversas populações celulares, como fibroblastos, células endoteliais e hepatócitos (Pilat et al., 2013).

1.5.1.2. Células-Tronco Mesenquimais

Células-tronco mesenquimais têm sido investigadas extensamente nos últimos anos como candidatas promissoras para uso na medicina regenerativa. A principal fonte para obtenção de CTM é a medula óssea, embora o isolamento destas células também tenha sido descrito a partir de sangue do cordão umbilical, sangue periférico, tecido adiposo, cordão umbilical, entre outros. A identificação das CTM é baseada em características específicas como a capacidade de aderir ao plástico, o formato fibroblastoide, a ausência de marcadores hematopoiéticos e a habilidade de diferenciar-se em células do tecido conjuntivo *in vitro*, especialmente adipócitos, condrócitos e osteócitos (Dahlke et al., 2004). Assim como as CTH, as CTM podem ser obtidas em grandes quantidades e retêm a capacidade de diferenciação em células tipo-hepatócito funcionais e células do epitélio hepático *in vitro*. Além da marcante plasticidade destas células, já foi demonstrada sua contribuição *in vivo* na geração de hepatócitos *de novo* e promoção de regeneração tecidual devido à secreção de moléculas tróficas (van Poll et al., 2008). Além disso, a propriedade imunomodulatória destas células ajuda a prevenir a rejeição após o transplante de órgãos inteiros ou na terapia celular com células-tronco hematopoiéticas (Pilat et al., 2013).

1.6. Fração Mononuclear da Medula Óssea

A medula óssea foi descrita como local de hematopoiese pela primeira vez no final dos anos 1800. A medula óssea pré e pós-natal exibe uma arquitetura complexa onde as células progenitoras e hematopoiéticas ocupam nichos compostos por diferentes tipos celulares (**Figura 4**), incluindo macrófagos regulatórios, osteoblastos, células endoteliais, adipócitos e elementos do sistema nervoso simpático (Lensch, 2012). A fração mononuclear da medula óssea (FMMO) de ratos, no entanto, é composta principalmente por linfócitos ($78,5 \pm 4,2\%$) e monócitos ($10,4 \pm 0,6\%$). Células precursoras endoteliais correspondem a $1,39 \pm 0,87\%$ do total, enquanto CTM e CTH compreendem $0,48 \pm 0,09\%$ e $0,48 \pm 0,37\%$, respectivamente (Baldo et al., 2010).

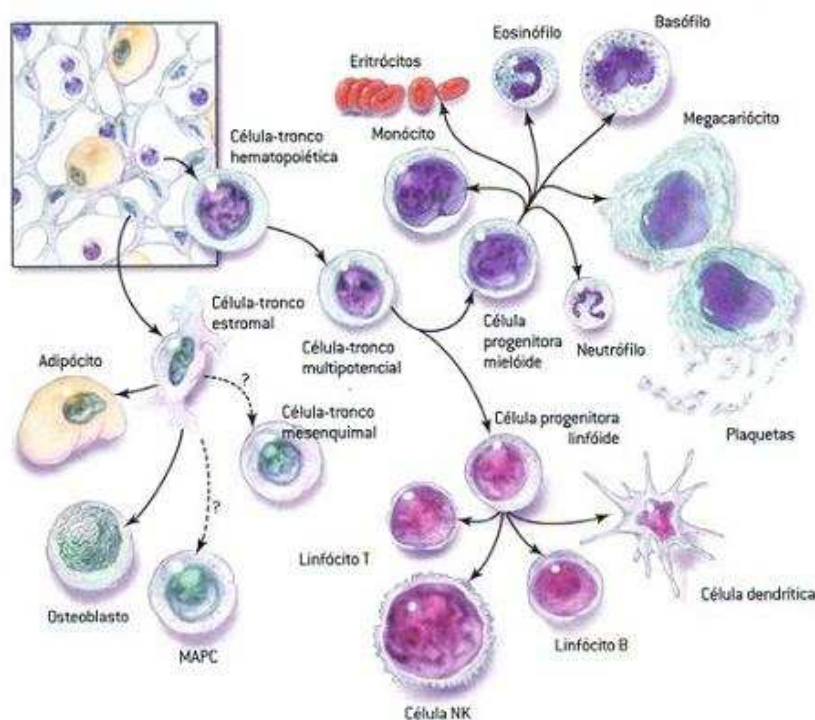


Figura 4. Representação das linhagens celulares presentes na medula óssea.

A caracterização das diferentes populações celulares da FMMO pode ser feita através da morfologia das células, suas características em cultura e do reconhecimento de marcadores de superfície celular. Dentre as células da FMMO, sabe-se que CTM, monócitos e macrófagos têm capacidade de aderência ao

plástico, podendo assim ser isoladas em cultura. Por outro lado, linfócitos e CTH compõem a fração não aderente da FMMO quando cultivadas *in vitro* (Phuc et al., 2012).

Algumas moléculas de superfície são particularmente úteis como marcadores fenotípicos para diferentes subpopulações celulares, assim como o grande número de anticorpos caracterizados tem facilitado a identificação das células baseado no fenótipo de superfície. Alguns cuidados, no entanto, devem ser tomados na hora de escolher marcadores celulares, pois podem existir variações entre as espécies e devido à cultura prolongada das células (da Silva Meirelles et al., 2008). A utilização desta metodologia em células da medula óssea de ratos é um tanto restrita em comparação a camundongos e humanos, devido à disponibilidade de anticorpos comerciais (Harting et al., 2008), embora já tenham sido publicados diversos trabalhos que mostram o fenótipo de marcadores nestas células (**Tabela 1**).

Tabela 1. Painel de moléculas de superfície celular da medula óssea de ratos.

Subpopulação celular	Marcadores	Referências
Célula-Tronco Hematopoiética	CD34+	Shu et al, 2004
	CD45+	Shu et al, 2004; Harb et al, 2009
	CD133+	Harb et al, 2009
	CD33+	Harb et al, 2009
Célula-Tronco Mesenquimal	CD29+	Karaoz et al, 2009
	CD90+	Karaoz et al, 2009; Harting, et al, 2008
	CD44+	Braga et al, 2008
	CD73+	Villanueva et al, 2011
	CD105+	Harting et al, 2008
Célula Precursora Endotelial	Stro-1+	Harting et al, 2008
	CD31 (PECAM-1)+	Harb et al, 2009
	CD133+	Harb et al, 2009
Monócitos/Macrófagos	ED1+ (CD68)	Grau, 2000
	CD11b+ (Ox42)	Grau, 2000
	ED9+	Grau, 2000

Nosso grupo vem trabalhando com o uso destas células na terapia celular de doenças hepáticas em modelos experimentais. A terapia com FMMO garantiu aumento na sobrevivência de ratos com lesão hepática aguda causada por acetaminofeno (Belardinelli et al., 2008), CCl₄ (Baldo et al., 2010) e hepatectomia parcial de 90% (Kieling, 2012).

Embora haja consenso acerca dos benefícios da terapia com células da FMMO, o modo de atuação dessas células ainda não foi totalmente esclarecido. Pelo menos três mecanismos de ação têm sido propostos. O primeiro deles é a fusão com células residentes, demonstrada no tecido hepático por Quintana-Bustamante e colaboradores (2005). A transdiferenciação em células do tecido lesionado é outro mecanismo sugerido, tendo sido demonstrada a diferenciação de células-tronco da medula óssea em células hepáticas *in vitro* por Jang e colaboradores (2004) e *in vivo* por Lagasse e colaboradores (2000). Além disso, mecanismos parácrinos, que atuam pela liberação de fatores solúveis como

citocinas e fatores de crescimento, também têm sido descritos (Liu et al., 2006; Van Poll et al., 2008).

A primeira evidência de que células da medula óssea poderiam dar origem a linhagens hepáticas foi apresentada por Petersen et al (1999). Neste trabalho, foi mostrado que células da medula óssea de ratos saudáveis eram capazes de incorporarem-se ao fígado lesionado de animais, reconstituírem as células precursoras hepáticas e diferenciarem-se em hepatócitos e células do epitélio hepático. A transdiferenciação de células-tronco em hepatócitos tem sido observada em diversos modelos *in vivo* de IHA. Entretanto, a variabilidade dos modelos e os diferentes momentos de análise das células ou de seguimento dos animais transplantados dificultam maiores comparações entre os estudos (Gilchrist & Plevris, 2010).

1.7. Células tipo-hepatócito

Os protocolos de diferenciação de células-tronco *in vitro* proporcionam um modelo simplificado e coerente à caracterização molecular e estudos de manipulação gênica (Heng et al., 2005).

A obtenção de células tipo-hepatócito tem sido descrita utilizando diferentes tipos celulares *in vitro*. Jang e colaboradores (2004) observaram expressão de albumina por CTH após 8 horas de co-cultivo com o fígado de animais submetidos à lesão hepática aguda por CCl₄. Lam e colaboradores (2010) obtiveram resultados semelhantes, porém com CTM. A expressão de albumina foi detectável a partir de 12 horas (primeiro ponto analisado) após o co-cultivo com hepatócitos isolados de animais tratados com D-Galactosamina. Além disso, Ruhnke e colaboradores (2005) demonstraram que monócitos isolados de sangue periférico, se submetidos a estímulos adequados, também são capazes de se diferenciar em hepatócitos.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, células da FMMO de ratos saudáveis foram microencapsuladas com alginato de sódio e transplantadas em animais com IHA induzida por CCl₄. As microcápsulas foram recuperadas após 48 horas e verificou-se a expressão de albumina pelas células da FMMO. Com o

intuito de obter um modelo *in vitro*, no qual seja possível controlar as variáveis típicas de um modelo animal, padronizamos um sistema de co-cultivo onde hepatócitos derivados de animais com lesão por CCl₄ são co-cultivados com a FMMO microencapsulada. A expressão de albumina *in vitro* foi observada após 6 horas de co-cultivo, assim como a produção de uréia pelas células da FMMO (Uribe et al., 2013 - submetido). O co-cultivo de hepatócitos e FMMO fornece um modelo que cria um micro-ambiente capaz de induzir a diferenciação celular, excluindo a possibilidade de fusão. Neste sistema só é permitida a passagem de fatores parácrinos, sem o contato direto entre as células. Além disso, facilita o isolamento das células hepáticas e da FMMO, posterior ao co-cultivo, para análise da expressão gênica e diferenciação celular (Luk et al., 2005).

No entanto, ainda não sabemos em qual ou em quais dos tipos celulares da FMMO acontece esta modificação e qual o mecanismo envolvido. O reconhecimento de tipos celulares específicos que atuam preferencialmente em diferentes tipos de lesão hepática reforça a necessidade da sua investigação na IHA. Já foi mostrado que células-tronco hematopoiéticas e macrófagos atuam especialmente na cirrose e fibrose avançada, enquanto células-tronco mesenquimais, por terem propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias importantes, trariam maior benefício no tratamento de lesões hepáticas autoimunes (Forbes & Newsome, 2012). Da mesma forma, há a necessidade de esclarecimento do mecanismo pelo qual o tecido lesionado promove a diferenciação destas células (Muraca, 2011).

1.7.1. Mecanismos de diferenciação de células tipo-hepatócito

Estudos recentes vêm mostrando possíveis mecanismos que regem a transdiferenciação de células derivadas da medula óssea, guiadas por estímulos do tecido lesionado. Um dos mecanismos sugeridos é através de microvesículas que atuam como mediadores da reprogramação celular ou modulação fenotípica. Como resultado da lesão, os tecidos liberam citocinas que atraem as células derivadas da medula óssea circulantes, e podem produzir microvesículas que carregam RNA, proteínas, receptores e uma variedade de sinais. Evidências

sugerem que estas microvesículas podem ser captadas pelas células derivadas da medula óssea e mediar a modificação do fenótipo destas células, tornando-as semelhantes às células do tecido lesionado (**Figura 5**) (Muraca, 2011; Quesenberry et al., 2010).

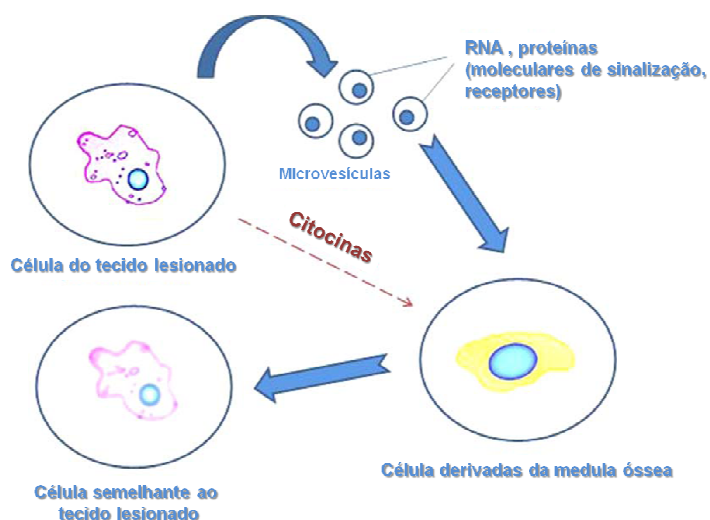


Figura 5. Microvesículas atuam como mediadoras na reprogramação celular. O tecido lesionado é capaz de atrair células derivadas da medula óssea circulantes e liberar microvesículas que carregam diversos tipos de moléculas sinalizadoras, resultando na diferenciação destas células, que adquirem um fenótipo semelhante ao das células do tecido lesionado (Muraca, 2011).

O esclarecimento dos mecanismos envolvidos em eventos de diferenciação em curtos períodos de tempos é importante para o avanço da medicina regenerativa, o que pode trazer benefícios para o tratamento de inúmeras doenças. Nosso grupo vem trabalhando com terapia celular para IHA e diferenciação celular de células da medula óssea (Baldo et al., 2010; Belardinelli et al., 2008; Uribe et al., 2013 - *submetido*). Neste trabalho, buscamos investigar o potencial de diferenciação de duas populações celulares da fração mononuclear da medula óssea em períodos de até 24 horas, e determinar possíveis mecanismos envolvidos nesse processo.

2. Objetivo

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar quais os tipos celulares da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) são capazes de se diferenciar em células tipo-hepatócitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as subpopulações da FMMO através da morfologia, dos marcadores de superfície celular e potencial de plasticidade;
- Avaliar a capacidade de diferenciação das duas populações celulares em células tipo-hepatócitos após co-cultivo com hepatócitos isolados de animais com ou sem lesão por CCl₄ por diferentes tempos;
- Determinar a capacidade das células diferenciadas de realizarem funções típicas de hepatócitos através de ensaios funcionais *in vitro*;
- Verificar a presença de microvesículas transportando material genético no meio de co-cultivo.

3. Artigo

A metodologia e os resultados deste trabalho estão apresentados sob a forma de manuscrito a ser submetido para a revista *Stem Cells*.

Bone marrow cells differentiate into hepatocyte-like cells:

which, when, how?

Laura Simon^{1,2}, Mónica Luján López^{1,2}, Carolina Uribe Cruz¹, Nelson Alexandre Kretzmann Filho¹, Davi Vergara¹, Lucia Mariano da Rocha Silla³, Ursula Matte^{1,2}

1. Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
2. Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
3. Center for Cell Technology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, do Rio Grande do Sul, Brazil

Laura Simon: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

Mónica Luján López: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

Carolina Uribe Cruz: conception and design, collection and/or assembly of data

Nelson Alexandre Kretzmann Filho: data analysis and interpretation

Davi Vergara: collection and/or assembly of data

Lucia Mariano Da Rocha Silla: conception and design

Ursula Matte: conception and design, analysis and interpretation, manuscript writing

Corresponding Author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

Zip Code: 90035-903

Fone: +55 51 3359 8841 / 8838

Fax: + 55 51 3359 8010

Email: umatte@hcpa.ufrgs.br

Key words : bone marrow mononuclear cells, cell differentiation,

hepatocyte-like cells, acute liver failure, microvesicles

Abstract

Bone marrow mononuclear cells (BMMC) have demonstrated the ability to differentiate into hepatocytes-like cells under several conditions. Here, we investigated the effect of injured hepatocytes over the differentiation of BMMC's non-adherent and adherent subsets separately, after depletion of monocytes (ED1⁺) by magnetic activated cell sorting (MACS). To induce differentiation process, we employed an *in vitro* co-culture model where isolated hepatocytes from animals with CCl₄-induced liver injury were co-cultured with BMMC subsets for 2, 6 and 24 hours. Gene expression analysis showed the presence of hepatocyte markers after 24 hours of co-culture only in the non-adherent subset. Non-adherent cells showed increase in urea production relative to time of exposure to injured hepatocytes. Remarkably, urea levels in CCl₄ group after 24h of co-culture were higher than in primary hepatocytes used as positive control. BMMC subsets co-cultured with healthy hepatocytes did not present signs of differentiation at any point analyzed. Analyzes of the supernatant from differentiated cells revealed the presence of microvesicles (MVs) carrying hepatocytes-specific mRNA, such as *Albumin*, suggesting a possible role of MVs in the induction of cell plasticity.

Introduction

Bone marrow mononuclear cells (BMMC) represent a potential source for cell based-therapies [1]. BMMC transplantation has shown great benefits in the treatment of patients and experimental models of acute liver failure [2–4]. However, there is still controversy regarding the mechanisms through which these cells contribute to the recovery of the damaged liver. So far, it has been suggested that bone marrow-derived cells can act by fusion with the host's cells, differentiation into hepatocytes-like cells and/or secretion of paracrine factors [5–7].

The ability to differentiate into hepatocytes-like and other hepatic cells has been attributed to various cell types. The first evidence was presented by Petersen and colleagues [8] that exogenous transplanted bone marrow cells could originate hepatocytes and ductal epithelium cells *in vivo*, under a pathological condition. Hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, and monocytes can be induced into cells exhibiting hepatic properties *in vitro* [9–11]. The identification of cell populations capable of generating hepatocytes has gained immense interest, not only as a promising cell source for cell-based therapy of liver diseases, but also as a potential cell source for *in vitro* models to be used in drug safety testing at preclinical stages of drug development, models for studying hepatogenesis, and development of bioartificial livers (BAL) [12–14].

In a previous study from our group, we observed that microencapsulated BMMC are inducible into hepatic lineage when exposed to injured liver, both *in vitro* and *in vivo* (Uribe C. *personal communication*). In the present study, we investigated the effect of injured hepatocytes on the differentiation of non-adherent and adherent

subsets of BMMC separately, after depletion of monocytes (ED1⁺) by magnetic activated cell sorting (MACS). For that matter, we employed an *in vitro* co-culture model excluding the possibility of cellular fusion. We also evaluated the presence of RNA shuttled by microvesicles (MVs), an important mechanism of cell-to-cell communication, in the supernatant of differentiated cells. This study attempted to clarify the different capacities of hepatic differentiation of the two subsets and to define the role of injury micro-environment in cell plasticity.

Material and Methods

Bone marrow mononuclear cells

Bone marrow mononuclear cells (BMMC) were isolated from male Wistar rats (n=12) at the age of 2-3 months. Animals were sacrificed in a CO₂ chamber under anesthesia. Tibia and femurs were removed and bone marrow was flushed out of the bones' cavity. Mononuclear cells were obtained by density gradient centrifugation with Ficoll Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA) at 2000 rpm for 20 minutes at room temperature. Mononuclear cells were collected and the monocytic lineage was depleted through negative magnetic cell sorting using MiniMACS (Miltenyi Biotec, Germany), in order to avoid contamination with monocytes in the adherent fraction. For negative selection, cells were labeled with primary antibody (1:100 v/v) Biotin Mouse Anti-Rat Mononuclear Phagocyte (ED1) (BD Biosciences Pharmingen, USA), incubated with the secondary antibody Anti-Biotin MicroBeads and then passed through a column attached to a strong magnetic field, according to the manufacturer's instruction. Labeled cells were retained in the column while ED1⁻ cells passed freely through the magnetic field.

The exclusion of ED1⁺ cells were confirmed by flow cytometry based in forward/side scatter (FSC/SSC) properties on Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, USA). BMMC ED1⁻ were seeded (1x10⁶ cells/insert) in 6-well cell culture inserts with basic medium (DMEM low-glucose (Gibco, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA). Cells were cultivated in a chamber at 37°C with 5% CO₂ for 72h to separate adherent and non-adherent fractions (Passage (P)=0).

Immunophenotyping of BMMC

BMMCs were collected for flow cytometry analyzes immediately after separating the adherent and non-adherent fractions (P=0) and at P=1, 2, and 3. Cells were labeled with a fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-conjugated primary antibody against rat cell-surface markers CD29 (integrin β_1 chain – mesenchymal marker), CD90 (Thy-1 antigen), CD45 (leukocyte common antigen – hematopoietic marker), and CD31 (PECAM-1 – endothelial marker) (all from BD Biosciences, USA). Cells were collected and detached when needed using 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, USA) and suspended at 10⁶ cells/mL. Cells were fixed in 2% formaldehyde for 20 min and incubated with primary antibody (1:100 v/v) for 30 min at 4°C, according to manufacturer's instruction. Detection of PE and FITC labeling was accomplished on Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, USA). At least 10,000 events were collected.

Multilineage differentiation (adipocytes and osteoblast)

Purified mesenchymal stem cells (MSCs) were obtained after expansion in culture (more than 3 passages). At 80% confluence, MSCs were passaged at a ratio of 1:2 using (0,25%) trypsin-EDTA (Gibco, USA). Basic medium was replaced twice a week.

MSCs at P=3 were used to induce adipogenic and osteogenic differentiation. Osteogenic differentiation was induced by culturing MSCs for up to 3 weeks in basic 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 µmol/L dexamethasone, 10µg/mL human insulin (Gibco, USA) and 100µmol/L indomethacin (Sigma, USA). To confirm differentiation, cells were fixed in 10% formalin and stained with Oil Red-O (Merck, Germany) at room temperature. All cultured cells were counterstained with hematoxylin. Cells were observed with an inverted phase-contrast microscope Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon, Japan). Photomicrographs were taken with a digital camera (Nikon, Japan), using NIS Elements D version 2.20.

Acute liver failure model

Acute liver failure was induced in male Wistar rats at the age of 2-3 months by the administration of CCl₄ (Merck, Germany) at 1.25 mg/kg weight in olive oil through gavage [3] 24h prior to hepatocytes isolation. Control animals received only

vehicle. Liver injury was assessed by macroscopic appearance of nutmeg liver and microscopic deposition of lipid droplets stained with Oil Red-O (Merck, Germany).

Hepatocytes isolation and culture

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats with acute liver failure (n=6) or healthy animals (n=6) by the two-step collagenase perfusion method as described by Seglen [15] with modifications [16], using Collagense type II (Gibco, USA). Hepatocytes were seeded in 6-well plates coated with type-I collagen (3×10^5 cells/well) and cultivated in DMEM low-glucose (Gibco) supplemented with 20% FBS (Gibco) and 1% P/S (Gibco) for 12h to adhere before co-culture experiments.

Co-culture system

To analyze the effect of injured hepatocytes over BMMC differentiation, we used a two-chamber co-culture system, where hepatocytes were placed on the lower chamber and BMMC were placed on the upper chamber isolated by a 6-well cell culture insert with 0.4 μ M pore sizes (BD Biosciences, USA). After hepatocytes have adhered, the medium was changed to basic medium and inserts were coupled in the wells containing the hepatocytes. Non-adherent and adherent cells (P=0) were transferred for co-culture immediately after separation (72h). Co-culture was kept for 2, 6 and 24h at 37°C with 5% CO₂ in basic medium.

RNA purification and gene expression analyzes

After the co-culture periods cited above, non-adherent cells and adherent were collected and total RNA were extracted using Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Germany). cDNA was synthesized using SuperScript® II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA) according to manufacturer's instruction and it was used as a template (100 ng) for polymerase chain reaction (PCR). PCR was performed with *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, USA), according to manufacturer's instruction, to analyze expression of hepatocytes-specific genes, such as *Albumin*, *Cytokeratin-18*, and *β-actin* as internal control (Table 1). RT-PCR products were stained with SYBR® Gold Nucleic Acid Stain (Invitrogen, USA) and checked in 1% agarose gel (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA). Gel images were captured using the photo documentation system L-Pix Chemi Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, Brazil).

Urea quantification

We analyzed the production of urea by adherent and non-adherent BMMC after co-culture protocol. Measurement of urea on culture medium was used to evaluate specific hepatic function. BM cells were washed with PBS 1X and placed in fresh basic medium. After 24h, 1mL of medium was collected and urea was quantified by QuantiChrom™ Urea Assay Kit (DIUR-500, BioAssay Systems, USA) according to the manufacturer's instructions.

Isolation of microvesicles (MVs)

The presence of MVs in cell culture supernatant was investigated as previously described [17]. Medium was collected from the upper chamber and centrifuged at

2,000 g for 20 minutes to remove debris. Cell-free supernatants were ultracentrifuged (100,000 g, 1 hour, 4°C) in HIMAC CP80WX ultracentrifuge (Hitachi, Japan). Pelleted material was fixed in formol 2% for flow cytometry analysis or stored at -80°C for RNA analysis. Supernatants of differentiated and undifferentiated BMMC, and of healthy and injured hepatocytes (CCl₄) were used to isolate MVs after 24 hours in culture.

Characterization of microvesicles (MVs)

The size of MVs was determined by flow cytometry analyses in Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). Attune Performance Tracking Beads (2.4 and 3.2 µm, Applied Biosystems) and non-adherent BMMC cells were used as size markers, and analysis was performed using a log scale for forward scatter and side scatter parameters, as described previously [18]. MVs were labeled with FITC- or PE-conjugated antibodies CD31, CD45, CD90 and CD29 (BD Biosciences) to determine the expression of those markers.

Rnase A treatment and RNA content analysis

Pelleted MVs were treated with Rnase A (40µg/mL) for 30 minutes at 37°C. RNA extraction was performed with Rneasy Mini Kit (QIAGEN) according to manufacturer's protocol. RNA content was then measured by spectrophotometry (Nanodrop ND-1000, USA). Total RNA was used as template to cDNA conversion with Super Script III (Invitrogen, USA) followed by qRT-PCR for *β-actin* (Rn00667869_m1), as internal control, and *Alb* (Rn00592480_m1), using TaqMan® Assays (Applied Biosystems, USA), accordingly with manufacturer's

instructions. All samples were run in duplicates using same amount of cDNA. Gene expression was calculated based on the normalized mean differences between target gene (*Alb*) and internal control (*β-act*). The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to calculate relative expression of each target gene. The calibrator group used for all comparisons was non-adherent cells cultured alone.

Statistical analysis

Statistical comparison was carried out using Student's *t* test, using SPAW v.18. Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

BMMC characterization

BMMCs' different populations were observed in flow cytometry due to their characteristics of FSC/SSC and expression of cell markers, according to Harting et al (2008). We were able to identify the areas in the scatter plot corresponding to lymphocytes (L), monocytes (M), MSC, and a small contamination with polymorphonuclear (PMN) and red blood cells (RBC) (Suppl. Figure 1-A). The absence of ED1⁺ cells after monocytic lineage depletion was confirmed (Suppl. Figure 1-B). Besides, when we analyzed the detached ED1⁺ cells from the MiniMACS column, they corresponded to the monocytes' area in the scatter plot (Suppl. Figure 1-C). However, it was observed the presence of CD45⁺ cells in the adherent fraction at P0, indicating that a specific population of hematopoietic and plastic-adherent cells, probably ED1⁺, skipped the negative selection. Over the first

three cell passages, CD45⁺ cells decline rapidly, whereas the percentage of cells expressing CD29 and CD90 rapidly increased. It was also observed an increase in the homogeneity of fibroblastic shape cells over passages (Figure 1). Adherent cells at P3 and P4 showed ability to differentiate into adipocytes and osteoblast, confirming their multipotency (Suppl. Figure 3). Taken together, these findings suggest that at least three passages are required to isolate a pure population of MSC following depletion of ED1⁺ monocytes. Non-adherent cells presented a heterogeneous expression of markers at P0. They were found to express CD29 and CD90 (MSC markers), CD45 (hematopoietic marker) and CD31 (endothelial marker). After P=1, cells were negative for CD31 and somewhat were positive for CD90 and CD29, whereas cells expressing CD45 prevailed (Figure 2).

Gene expression analyzes

Although there was a marked difference in cell population profile between P0 and P3, all experiments were conducted at P0. RNA was obtained from adherent and non-adherent cells exposed to 2, 6 and 24h of co-culture with hepatocytes isolated from control or CCl₄-treated rats. cDNA was synthesized and used as template to verify expression of liver-specific genes. We observed that non-adherent cells were expressing *Albumin* and *Ck-18* after 24 hours of co-culture (Figure 3), whereas cells exposed to shorter periods of co-culture did not express hepatic markers. Adherent cells, however, did not express hepatic markers at any time.

Urea production

The amount of urea in culture medium was assessed to analyze the hepatic functionality of BM cells after co-culture protocol. Non-adherent cells showed increase in urea production relative to time of exposure to injured hepatocytes. Remarkably, urea levels in CCl₄ group after 24h of co-culture were higher than in primary hepatocytes used as positive control and were significantly different from control group (non-adherent cells co-cultured with healthy hepatocytes; $p = 0.004$). Adherent cells also expressed significant levels of urea after 24h of co-culture with injured hepatocytes, but were lower than non-adherent cells ($p = 0.026$). In general, urea production in control group was much lower than in CCl₄ group (Figure 4).

Isolation and characterization of MVs

Supernatant-isolated MVs were detected by flow cytometry below the forward scatter signal corresponding to 2.4 μm beads (Figure 5A). Immunophenotyping analysis of non-adherent cells-derived MVs showed the presence of membrane markers known to be expressed in non-adherent cells. However, MVs obtained from co-culture supernatants presented lower percentage of non-adherent cells membrane markers (Figure 5B), revealing the presence of MVs from a different source, which probably indicate the release of MVs from hepatocytes.

RNase treatment and RNA content analysis

RNA was found to be contained in supernatant-isolated MVs as total RNA extracted from MVs decreased significantly after treatment with RNase A (Figure 6A). Similar amounts of RNA were detected in all groups tested (non-adherent

cells alone, healthy hepatocytes alone, CCl₄-injured hepatocytes alone, non-adherent cells co-cultured with healthy hepatocytes and non-adherent cells co-cultured with CCl₄-injured hepatocytes). Gene expression analysis showed the presence of *Alb* in the co-culture of differentiated cells. Interestingly, there was no evidence of MVs carrying *Alb* in the supernatant of undifferentiated cells, including non-adherent cells co-cultured with healthy hepatocytes (Figure 6B). Internal control (β -actin) mRNA was detected in all groups.

Discussion

The ability to differentiate into hepatocytes-like cells *in vitro* has been attributed to different subsets of bone marrow-derived cells, such as hematopoietic stem cells (HSC), mesenchymal stem cells (MSC), and monocytes [6, 10]. It has been suggested that one important step toward the success of cell-based therapies is the choice of therapeutic cell, which need to be tailored to the type of liver disease targeted as the required therapeutic effect may vary among different subsets of stem cells [19]. Here, we investigated the potential of different subsets of BMMC, characterized as non-adherent and adherent fractions, to differentiate under the stimuli of injured hepatocytes.

First, we depleted the monocytic lineage of BMMC, known as ED1⁺ cells of the bone marrow of rats [20, 21], aiming to obtain a purified population of MSC in the adherent fraction. Although the negative selection was demonstrated to be effective (Suppl Figure 1), we observed the presence of hematopoietic cells (CD45⁺) in the adherent fraction at P=0, by the time cells were used to induce hepatic differentiation. This result confirm the need for previous expansion in

culture to obtain a purified population of MSC, despite the depletion of ED1⁺, and/or the combination of other markers for negative selection [20, 22]. Although also heterogeneous, the non-adherent subset was predominantly constituted by lymphocytes, HSC and other hematopoietic progenitor in different stages of maturation. Our results showed the expression of markers such as CD45, CD31 (endothelial marker), CD29 (MSC marker) and CD90 (MSC and HSC marker) at P=0. And, as observed for the adherent population, there is a trend for purification over time in culture, remaining the CD45⁺ cells.

In vitro models of differentiation usually make use of supplemented media with specific growth factors that mimic the embryogenesis of the liver over a period of at least 3 weeks, including endoderm induction, hepatic specification, expansion, and maturation. Furthermore, the functionality of differentiated cells may be required to be tested *in vitro* and *in vivo* [14, 23]. However, early events of differentiation have been reported under several experimental conditions. Jang and colleagues (2004) demonstrated that the HSC expressed genes and proteins specific for hepatocytes, such as Albumin, after 8 hours of co-culture with injured liver cells [9]. In a previous work from our group, we observed that microencapsulated BMSC express *Albumin* after 6 hours of co-culture with CCl₄-injured hepatocytes, and were able to produce and secrete urea (*Uribe C. personal communication*). Both works have shown that BMSC exposed to damaged liver tissues are capable of taking on many characteristics of liver cell types without cell fusion.

Similarly, in this work we observed hepatocyte-like characteristics in non-adherent cells from BMSC after co-culture with damaged hepatocytes, which was not

observed when BMMC were co-cultured with healthy hepatocytes. Gene expression of hepatocytes markers, such as *Albumin* and *Citokeratin-18*, was noted after a period of 24 hours of exposure to injury, a longer period than the observed in the differentiation of HSC (8 hours) [9] and whole BMMC in our previous work (6 hours; data not published). However, even though hepatocyte-specific mRNAs were not seen at any point before 24 hours, considerable amount of urea in the medium of non-adherent cells was detected after 6 hours of co-culture.

Unexpectedly, we did not observe differentiation in the adherent fraction, although MSCs have been described as cells with great potential for transdifferentiation into several cell types [24–27]. This can be explained by at least two reasons: 1) the heterogeneity seen in this subset, which only express MSC characteristic membrane markers at P=3 (Figure 1); and 2) the smaller number of cells used in co-culture experiment, since the effective growth area of the insert (4.2 cm²) restrains the number of cells that adhere (up to 5x10⁵ cells). Strengthening the heterogeneity hypothesis, adherent cells were able to differentiate into adipocytes and osteocytes when properly stimulated after the third passage (Suppl Figure 3). These events of rapid differentiation after injury exposure have usually been interpreted as humoral induction of differentiation, but several studies have suggested that it could be due to microvesicular transfer of information [28, 29]. Alliota and colleagues (2007) suggested that radiation-injured lung releases microvesicles containing pulmonary epithelial cell-specific RNA, which then enter marrow cells, inducing them to express lung-specific mRNA [28]. There is evidence of increased vesicular transfer of information in specific conditions,

including irradiation, hypoxia, oxidative injury, diabetes, sepsis, thromboembolic disease, rheumatoid arthritis and cancer [28, 30, 31]. Moreover, embryonic stem cells-derived MVs are capable of de-differentiate hematopoietic progenitors through horizontal transfer of mRNA [32]. HSC and MSC have also been shown to communicate with other cell types through MVs carrying not only proteins, bioactive lipids and mRNAs but also microRNAs [33].

In order to investigate whether the differentiation seen here was induced by MVs, we analyzed the supernatants of cells in culture and co-culture. MVs isolated from the supernatant of non-adherent cells in culture alone presented the characteristic pattern of membrane markers of non-adherent cells (CD45⁺), however, when MVs were isolated from the supernatant of co-culture with injured hepatocytes, the percentage of MVs expressing CD45 was lower, suggesting the presence of hepatocytes-derived MVs. The percentage of CD29⁺ MVs in the supernatant of differentiated cells (non-adherent cells co-cultured with CCl₄-injured hepatocytes for 24 hours) were similar to that of non adherent cells alone (21.37 and 21.46%, respectively). Interestingly, β 1-Integrin (CD29) is a known marker of exosomes, a discrete population of nanometer-sized (30-150 nm) vesicles secreted by a variety of cells, including hepatocytes [34].

Moreover, MVs in the supernatant of differentiated hepatocyte-like cells carried *Albumin* and *β -actin* mRNAs. It has been reported the presence of Albumin, as well as β -actin, at both mRNA and protein levels within MVs released by hepatocytes [17, 34]. Taken together, these findings suggest that mRNA shuttled MVs may be an important player in the plasticity observed here.

Conclusion

In this study we demonstrate that non-adherent fraction of BMMC express hepatocytes-like characteristics after co-cultured with injured hepatocytes within a short period of time. Our findings suggest that microvesicles released from the damaged tissue may be one of the mechanisms affecting cell plasticity.

Acknowledgements

This work was made possible by support from FIPE-HCPA (n. 12-0208) and PRONEX (FAPERGS/CNPq n. 008/2009)

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

1. Muraca M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. **DIG. LIVER DIS.** 2011;43(3):180–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869923>.
2. Park C-H, Bae SH, Kim HY, et al. A pilot study of autologous CD34-depleted bone marrow mononuclear cell transplantation via the hepatic artery in five patients with liver failure. **CYTOTHERAPY** 2013;(January):1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849977>.
3. Baldo G, Giugliani R, Uribe C, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl(4) acute liver damage. **DIG. DIS. SCI.** 2010;55(12):3384–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20397054>.
4. Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, et al. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. **TOXICOLOGY** 2008;247(1):1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336983>.
5. Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV, et al. Hematopoietic Mobilization in Mice Increases the Presence of Bone Marrow–Derived Hepatocytes Via In Vivo Cell Fusion. **HEPATOLOGY** 2006;43(1):108–16.
6. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **NAT. MED.** 2000;6(11):1229–34.
7. Liu ZC, Chang TM. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. **LIVER TRANSPLANT.** 2006;12:566–72.
8. Petersen BE. Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. **SCIENCE** 1999;284(5417):1168–70. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5417.1168>.
9. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **NATURE** 2004;6:532–9.
10. Luk JM, Wang PP, Lee CK, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells: Development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. **J. IMMUNOL. METHODS** 2005;305:39 – 47.

11. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, et al. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. **GASTROENTEROLOGY** 2005;128:1774–86.
12. Heng BC, Yu H, Yin Y, et al. Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. **JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY** 2005;20:975–87.
13. Soto-Gutierrez A, Basma H, Navarro-Alvarez N, et al. Differentiating Stem Cells into Liver. **BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV.** 2008;25(1):149–64. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5661/bger-25-149>.
14. Battah F Al, Kock J De, Vanhaecke T, et al. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. **SCIENTIFIC WORLD JOURNAL.** 2011;11:1568–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3201629&tool=pmc&rendertype=abstract>.
15. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. **METHODS CELL BIOL** 1976;13:29–83.
16. Rodrigues D, Reverbel T, Matte U, et al. Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. **ARQGA** 2012;(4):291–5.
17. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, et al. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. **EXP. HEMATOL.** 2010;38(3):233–45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2829939&tool=pmc&rendertype=abstract>.
18. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **J. AM. SOC. NEPHROL.** 2009;20(5):1053–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2676194&tool=pmc&rendertype=abstract>.
19. Forbes SJ and Newsome PN. New horizons for stem cell therapy in liver disease. **JOURNAL OF HEPATOLOGY** 2012;56:496–9.
20. Harting MT, Jimenez F, Pati S, et al. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. **CYTOTHERAPY** 2008;10(3):243-53.
21. Grau V, Scriba a, Stehling O, et al. Monocytes in the rat. **IMMUNOBIOLOGY** 2000;202(1):94–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879693>.

22. Schrepfer S, Deuse T, Lange C, et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. **STEM CELLS DEV.** 2007;16(1):105–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17348808>.
23. Chen B-Y, Wang X, Chen L-W, et al. Molecular targeting regulation of proliferation and differentiation of the bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mesenchymal stromal cells. **CURR. DRUG TARGETS** 2012;13(4):561–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443584>.
24. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. **BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.** 2005;330(4):1153–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823564>.
25. Shu S-N, Wei L, Wang J-H, et al. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. **WORLD J. GASTROENTEROL.** 2004;10(19):2818–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334677>.
26. Crobu F, Latini V, Marongiu MF, et al. Differentiation of single cell derived human mesenchymal stem cells into cells with a neuronal phenotype: RNA and microRNA expression profile. **MOL. BIOL. REP.** 2012;39(4):3995–4007. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21773948>.
27. Guan J, Wang F, Li Z, et al. The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cells in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics. **BIOMATERIALS** 2011;32(24):5568–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570113>.
28. Aliotta JM, Sanchez-Guijo FM, Dooner GJ, et al. Alteration of marrow cell gene expression, protein production, and engraftment into lung by lung-derived microvesicles: a novel mechanism for phenotype modulation. **STEM CELLS** 2007;25(9):2245–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376082&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>.
29. Quesenberry PJ, Dooner MS, Aliotta JM. Stem cell plasticity revisited: the continuum marrow model and phenotypic changes mediated by microvesicles. **EXP. HEMATOL.** 2010;38(7):581–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887723&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>.
30. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. **PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A.** 2005;102(8):2892–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=548330&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

31. Logozzi M, Milito A De, Lugini L, et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. **PLOS ONE** 2009;4(4):e5219. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
32. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **LEUKEMIA** 2006;20(5):847–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453000>.
33. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. **PLOS ONE** 2010;5(7):e11803. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
34. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. **JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH** 2008;7:5157–66.

Tables

Table 1. Primers and condition for RT-PCR

Gene	Primer sequence	Annealing temperature	PCR product size (bp)
<i>Alb</i>	For: 5'GGTATGAATATGCAAGAAG3' Rev: 5'CACTCTTCCCAGGTTTCTTG3'	47°C	350
<i>Ck-18</i>	For: 5'GGACCTCAGCAAGATCATGGC3' Rev: 5'CCAGGATCTTACGGGTAGTTG3'	58°C	518
<i>β-act</i>	For: 5'CAAGATCATTGCTCCTCCTGAG3' Rev: 5'GACTCATCGTACTCCTGCTTGCC3'	60°C	150

Alb, Albumin; *Ck-18*, Cytokeratin-18; *β-act*, *β-actin*.

Figures

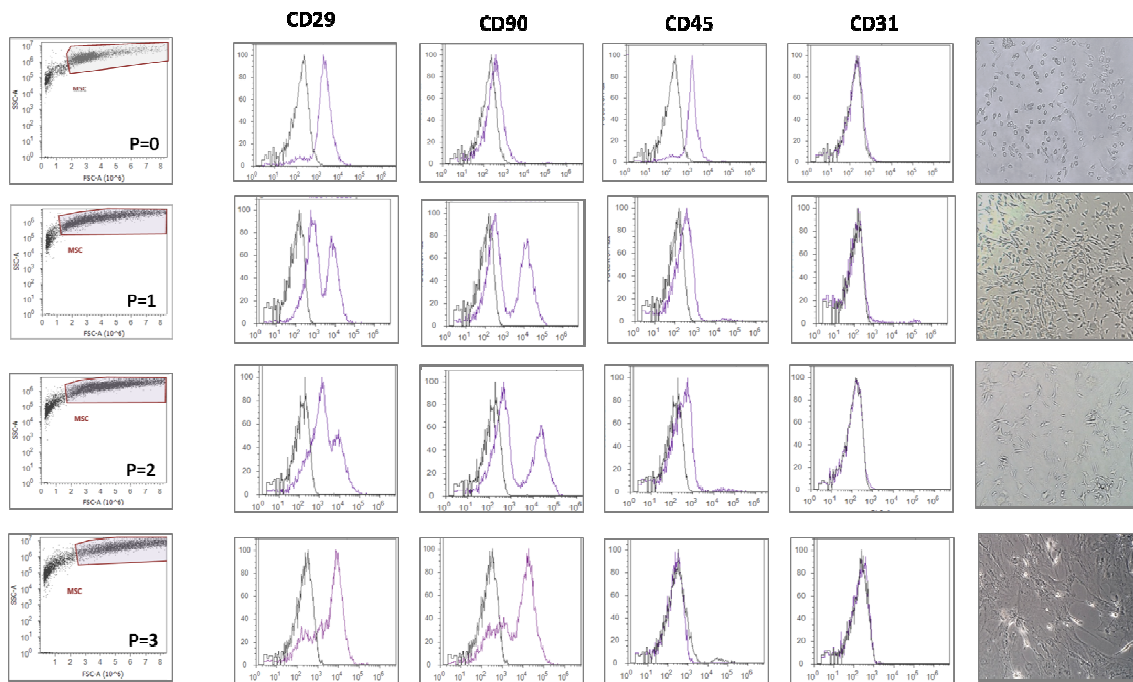


Figure 1. Immunophenotype of adherent cells analyzed over three passages.

Histograms show an increase in MSC markers CD29 and CD90 and a decrease in hematopoietic marker CD45. CD31, an endothelial marker was not detected at any point. Right column represent the scatter plot with the gated cell population. Left column show the morphology of cells in culture by the time of immunophenotyping.

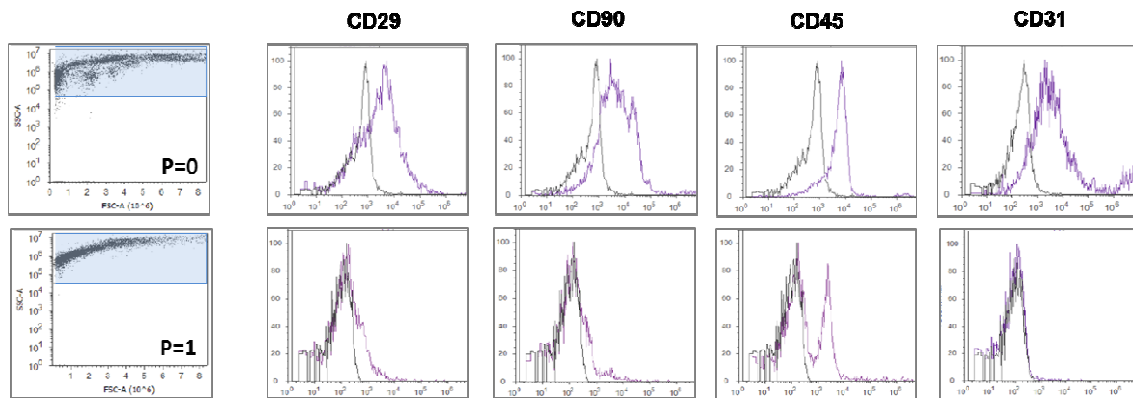


Figure 2. Expression of markers in non-adherent cells from BMSC over time of culture. Non-adherent cells were found to express CD29 and CD90 (MSC markers), CD45 (hematopoietic marker) and CD31 (endothelial marker) at P0. At P1, cells were negative for CD31 and somewhat were positive for CD90 and CD29, whereas cells expressing CD45 prevailed.

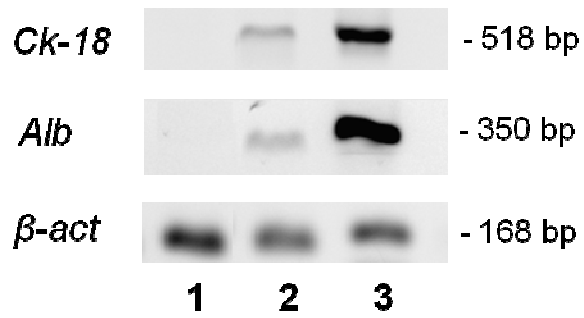


Figure 3. Gene expression analyzes of hepatocyte markers. RT-PCR of BM non-adherent cells after 24h of co-culture with healthy (1) or injured hepatocytes (2). *β-act* was used as control of RNA quality. Lane 3 represents expression of hepatocytes. *Ck-18*, *citokeratin-18*; *Alb*, *albumin*; *β-act*, *β-actin*.

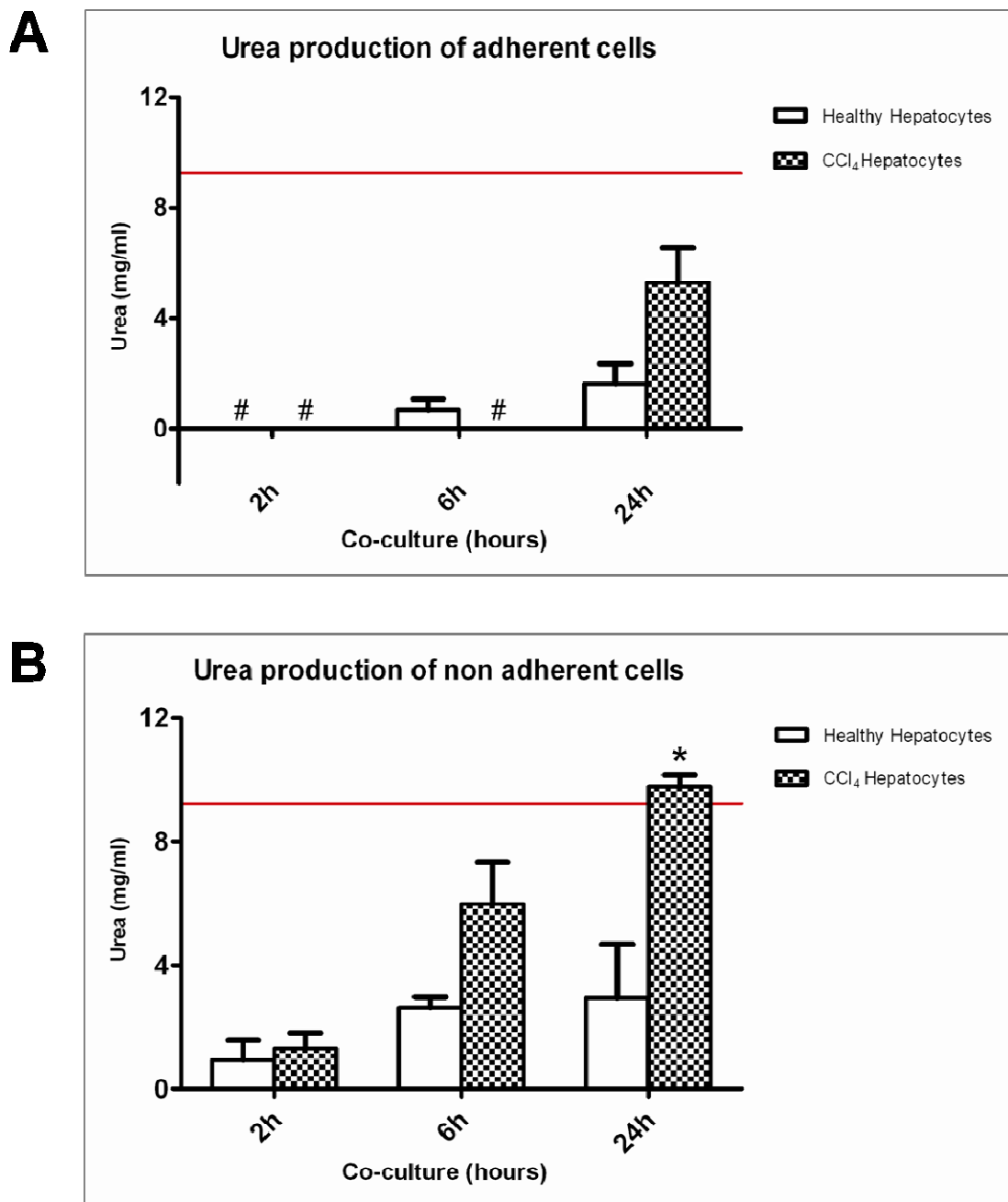


Figure 4. Urea expression by BM adherent (A) and non-adherent cells (B) after co-culture with healthy hepatocytes and injured hepatocytes. Non-adherent cells showed increase in urea production relative to time of exposure to injured hepatocytes. Urea levels in CCl₄ group were higher than hepatocytes levels after 24h of co-culture. Red lines represent urea measured in supernatant

from hepatocytes culture. Urea concentration in culture medium is expressed in mg/ml. # non-detectable urea levels. * $p=0.004$.

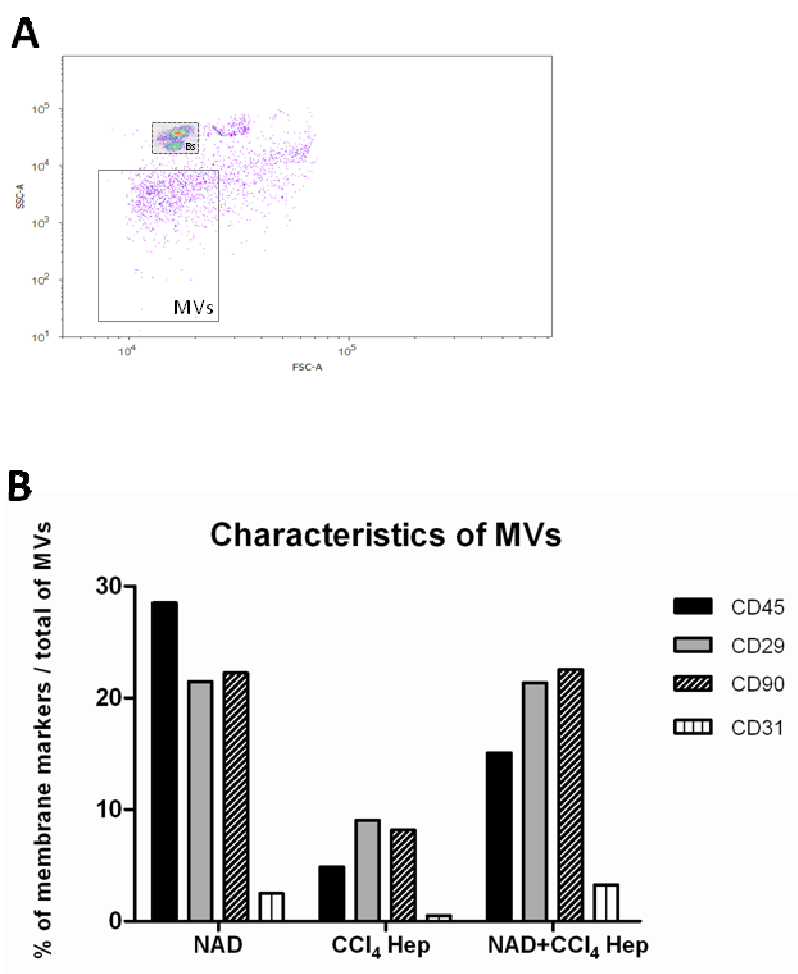


Figure 5. Evidence of supernatant-isolated MVs. (A) Representative cytometry analysis of supernatant-isolated MVs and of 2.4- and 3.2- μ m beads used as internal size standards (dotted square); (B) Expression of membrane markers of MVs evaluated by flow cytometry. MVs were isolated from supernatant of non-adherent cells (NAD), CCl₄-injured hepatocytes (CCl₄ Hep) and co-culture after differentiation.

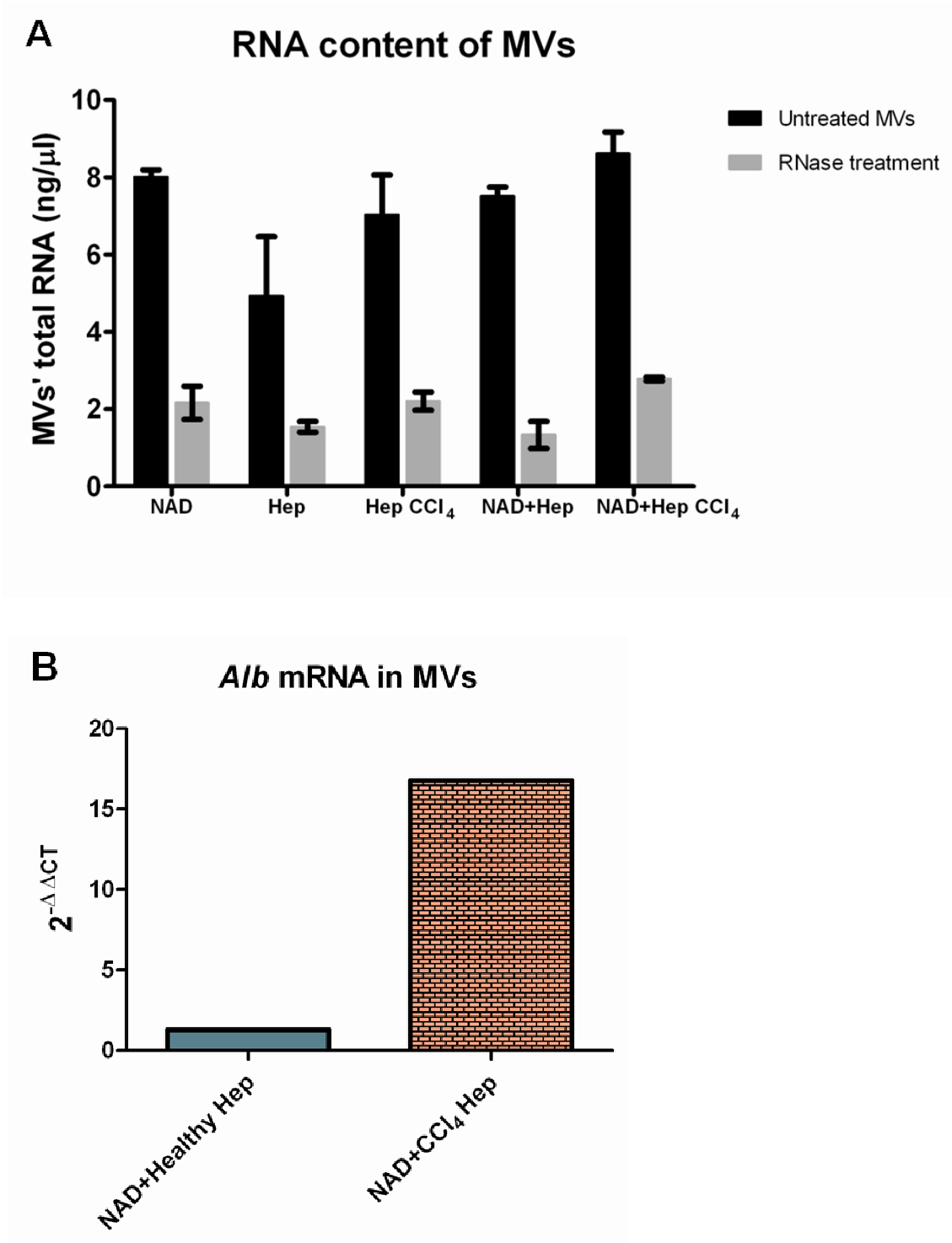
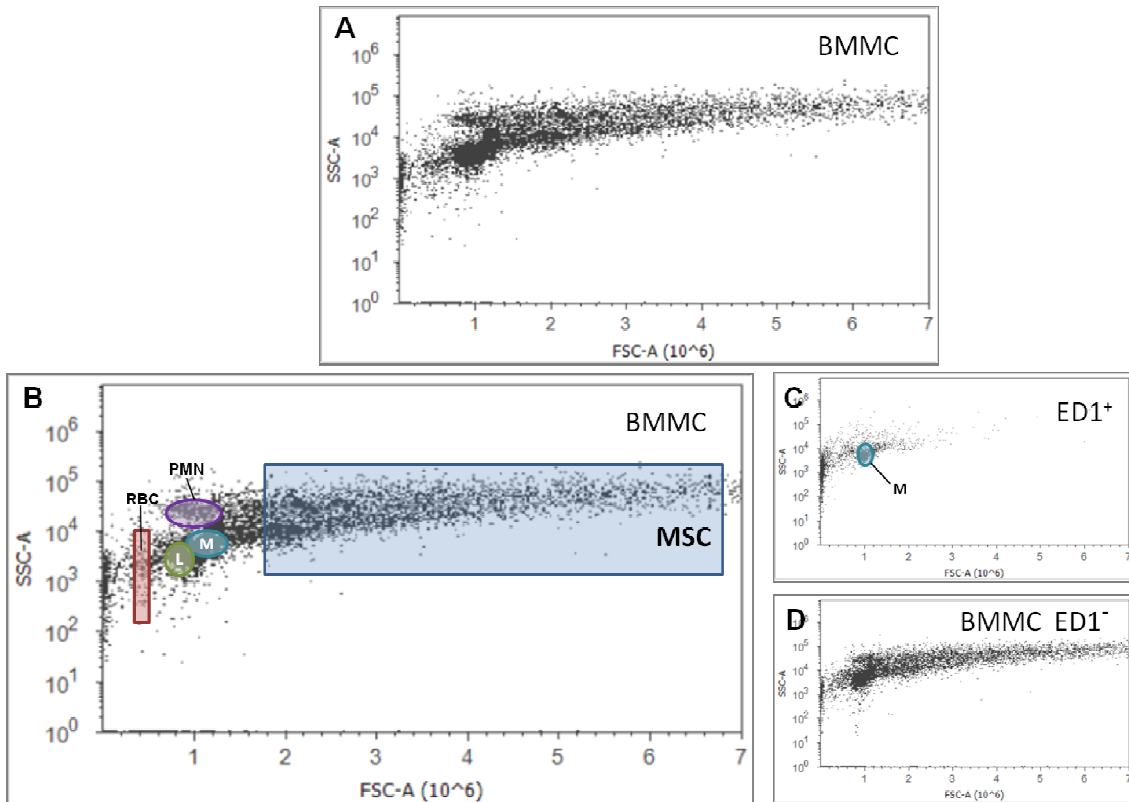
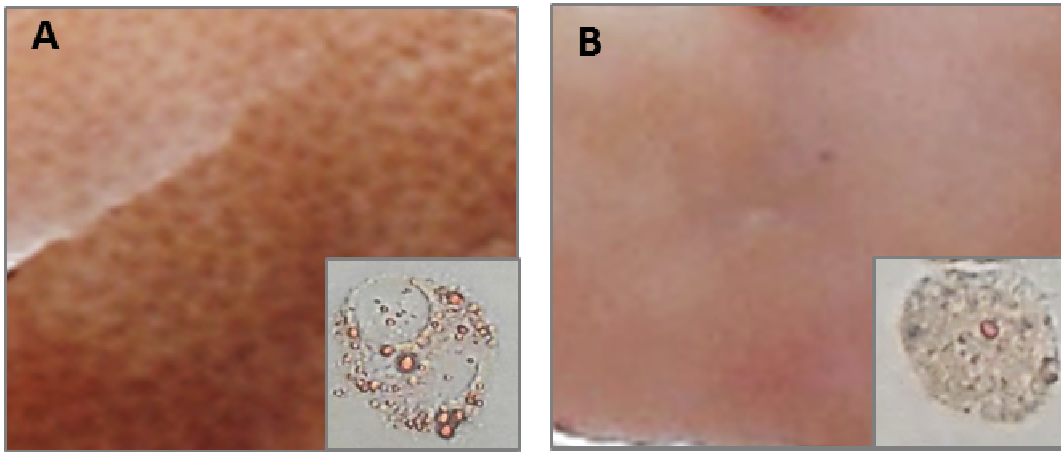


Figure 6. Analysis of RNA content of MVs. (A) Total RNA extracted from MVs decreased after RNase A treatment. (B) Detection of *Alb* mRNA in MVs from supernatants of differentiated cells (non-adherent cells after 24 hours of co-culture with CCl₄-injured hepatocytes).

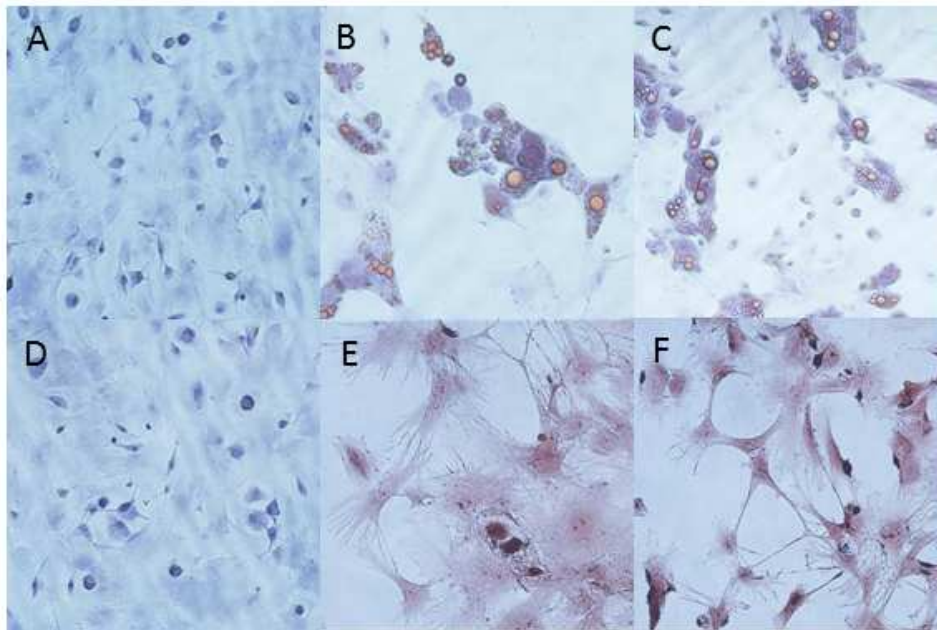
Supplementary Material



Supplementary Figure 1. Characterization of BMMC cell population by flow cytometry. Scatter plot of BMMC with identification of cell populations (A and B). Cells detached of the magnetic column after ED1+ negative selection appeared in the monocyte area (C). Cells that passed freely through the magnetic column are shown in D.



Supplementary Figure 2. Aspects of injured and healthy liver. Macroscopic aspect of nutmeg liver 24 hours after CCl_4 administration (A) and healthy liver (B). Microscopic aspect of hepatocytes in culture after oil red staining showing lipid droplets in injured and healthy hepatocytes.



Supplementary Figure 3. Adipogenic and osteogenic differentiation capacity of MSCs. Cells cultivated with basic medium remained with MSC characteristics (A and D). Cells exposed to adipogenic medium acquired lipid droplets stained orange with Oil Red O (B and C), whereas cells exposed to osteogenic medium presented calcium deposited in the extracellular matrix stained red by Alizarin Red S (E and F). Cells used in the protocol were at P=3. Magnification 200X.

4. Discussão

A utilização de células-tronco no tratamento de doenças hepáticas pode tornar-se realidade em pelo menos quatro grandes áreas: (1) para estimular a regeneração e reduzir o processo de fibrose através da modulação da regeneração do fígado cirrótico; (2) diminuir a resposta imune desencadeada pelo dano hepático; (3) fornecer células tipo-hepatócitos derivadas de células-tronco para uso em fígados bioartificiais extracorpóreos; (4) utilização de células tipo-hepatócitos derivadas de células-tronco na terapia celular para suprir ou substituir a função hepática (Forbes & Newsome, 2012). O interesse na identificação de populações celulares capazes de se diferenciar em células tipo-hepatócitos tem ganhado grande atenção, não somente como uma promissora fonte de células para terapia celular de doenças hepáticas, mas também como potencial fonte celular para modelos *in vitro* de testes pré-clínicos de medicamentos, modelos para estudo da hepatogênese, e desenvolvimento de fígados bioartificiais (Heng et al., 2005; Soto-Gutierrez et al., 2008; Al Battah et al., 2011).

O conhecimento de células com potencial terapêutico para o tratamento de doenças hepáticas como a IHA é de extrema relevância, visto que o único tratamento disponível atualmente é o transplante hepático, o qual, devido à escassez de órgãos e complicações pós-cirúrgicas, está associado a uma alta mortalidade (Vosough et al., 2011). Para que a terapia celular seja efetiva, é necessária a disponibilidade das células para transplante em curtos períodos de tempo. Também, há evidências de que a utilização de células-tronco previamente diferenciadas em células tipo-hepatócitos aumenta a chance de incorporação ao fígado lesionado. Dessa forma, é importante o reconhecimento de células de fácil obtenção e que possuam capacidade de diferenciação nestas condições (Heng et al., 2005).

A possibilidade de alterar um fenótipo celular previamente estabelecido traz uma grande promessa para o futuro da medicina regenerativa. A primeira descrição de um evento de diferenciação de células da medula óssea em células tipo-hepatócitos foi publicada por Petersen e colaboradores (1999), que mostraram que as células da medula óssea transplantadas eram capazes de se incorporar ao fígado de animais com lesão hepática e auxiliar no processo

regenerativo. Este trabalho colaborou com o crescente número de evidências demonstrando a capacidade plástica de células do organismo adulto (Petersen et al., 1999). Desde então, estudos têm mostrado evidências de diferenciação de vários tipos celulares em células tipo-hepatócitos. Nosso grupo mostrou primeiramente que células da FMMO podiam se incorporar ao fígado lesionado e adquiriam fenótipo semelhante ao de hepatócitos quando transplantadas em animais com IHA (Baldo et al., 2010). Posteriormente, verificamos que as células da FMMO microencapsuladas passavam a expressar marcadores hepáticos após 48 horas em um ambiente de lesão hepática *in vivo* e, após 6 horas de co-cultivo com hepatócitos lesionados, estas células expressavam albumina e produziam ureia (Uribe et al., 2013 – submetido).

O modelo de indução de lesão hepática utilizado nos trabalhos acima descritos foi através da administração de CCl₄ por gavagem. Da mesma forma, utilizamos este modelo para induzir a IHA e avaliar a diferenciação das células da FMMO através da exposição ao microambiente da lesão. A administração do CCl₄ foi feita em dose única 24 horas antes do isolamento de hepatócitos para os experimentos *in vitro*. A dose utilizada para indução da IHA (1,25 mg/kg de peso corpóreo) já havia sido padronizada anteriormente (Baldo et al., 2010). A confirmação da lesão hepática foi determinada pelo aspecto macroscópico do fígado, com característica de ‘fígado em noz-moscada’ e pela deposição de gordura observada nos hepatócitos microscopicamente (esteatose).

No presente trabalho, utilizamos duas populações da FMMO separadamente para avaliar seu potencial de diferenciação em um microambiente de lesão. A FMMO contém pelo menos duas populações celulares com capacidade de diferenciação: células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM). Estas populações podem ser separadas *in vitro* devido ao seu comportamento em cultura. CTM são capazes de aderir ao plástico, enquanto que as CTH permanecem em suspensão em condições normais de cultivo (Phuc et al., 2012). Monócitos presentes na FMMO, no entanto, possuem capacidade de aderência, mas diferentemente das CTM, são eliminados da cultura num período que varia de 3 a 10 passagens (Schrepfer et al., 2007; Harting et al., 2008). Na tentativa de obter uma cultura purificada de CTM em um

curto período de tempo, realizamos a depleção da linhagem monocítica, através do marcador ED1, altamente expressos por monócitos da medula óssea de ratos (Grau et al., 2000). A seleção negativa foi realizada em coluna magnética (MiniMACS) após a marcação das células ED1⁺ com beads magnéticas.

A verificação da seleção negativa foi feita por citometria de fluxo, através das características morfológicas das células, como tamanho e complexidade. Foi possível identificar algumas populações celulares com uso de marcadores de superfície (CD) característicos e distribuição das células por suas propriedades de *forward scatter* e *side scatter*, de acordo com Harting e colaboradores (2008). Os marcadores utilizados foram o CD45 (*Leukocyte Common Antigen*; expresso em células da linhagem hematopoiética, inclusive CTH), CD29 (*β1-integrin*; expresso em CTM), CD90 (*Thy-1*; expresso em CTM e CTH) e CD31 (PECAM-1 – *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*; expresso em células endoteliais). As células CD45⁺ representam linfócitos, monócitos e precursores hematopoiéticos, como as CTH. Após a depleção dos monócitos, as células ED1⁺ foram eluídas da coluna magnética e analisadas por citometria, o que nos permitiu identificar as áreas correspondentes aos monócitos e, conseqüentemente, dos linfócitos. A área correspondente as CTM foi confirmada posteriormente após as diversas passagens das CTM em cultura, e através da expressão dos marcadores CD29 e CD90.

Após a depleção dos monócitos, mantivemos as células ED1⁻ em cultura por 72 horas para separação das frações aderentes e não-aderentes. Observamos, através da análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo, que as populações celulares em P=0 (imediatamente após a separação) eram constituídas por grupos heterogêneos de células. Pelo menos 3 passagens foram necessárias para a obtenção de uma cultura purificada de CTM (CD45⁻, CD31⁻, CD29⁺, CD90⁺) enquanto que a fração não-aderente apresentou rápido declínio dos marcadores, inclusive CD90, prevalecendo as células CD45⁺ após 1 semana em cultura. A expressão de CD90 é geralmente associada à CTM, embora sua expressão tenha sido relatada também em CTH e células progenitoras hepáticas (Shu et al., 2004). É importante ressaltar que os experimentos de diferenciação das frações da FMMO em células tipo-hepatócitos

foram conduzidos com as células em P=0. A utilização das frações previamente purificadas em cultura não foi possível de ser realizada até o presente momento, mas acreditamos ser relevante para a melhor caracterização destas células e determinação do potencial de diferenciação.

Os resultados deste trabalho mostraram que as células da fração não-aderente são capazes de expressar marcadores hepáticos quando em co-cultivo com hepatócitos lesionados e após 24 horas. Nos demais tempos analisados (2 e 6 horas), não observamos nem a expressão de genes hepáticos, nem a produção significativa de uréia. O tempo necessário para a diferenciação aqui observado difere do trabalho anteriormente realizado pelo nosso grupo, em que a FMMO total microencapsulada apresenta marcadores hepáticos após 6 horas de co-cultivo com hepatócitos lesionados. A ausência de sinais de diferenciação nas células da fração aderente foi um achado intrigante, uma vez que existem muitas evidências na literatura que mostram o potencial de diferenciação destas células em células tipo-hepatócitos, através da estimulação com fatores de crescimento específicos (Shu et al., 2004; Banas et al., 2007) ou co-cultivo com hepatócitos ou fragmentos de fígado (Lange et al., 2005; Jang et al., 2004). Uma possível explicação para a ausência de diferenciação observada nas células da fração aderente é devido ao menor número de células utilizado no experimento de co-cultivo. As células aderentes foram cultivadas diretamente sobre a membrana do inserto de co-cultivo e a área do inserto (4,2 cm²) permite um número máximo de 5x10⁵ células aderidas por inserto. Entretanto, a utilização do inserto não é um fator limitante no número de células da fração não-aderente. Também é importante lembrar que a maioria dos trabalhos utiliza CTM purificadas após diversas passagens em cultura ou seleção positiva através de marcadores de superfície específicos, enquanto que neste trabalho foi utilizada uma população heterogênea de células aderentes da FMMO.

O impacto do tecido lesionado sobre a mudança no fenótipo de células da medula óssea permanece em aberto, apesar de diversos indícios mostrando esse fenômeno. Um aspecto importante na determinação da labilidade destas células é a fase do ciclo celular em que elas se encontram (Quesenberry et al., 2007). Evidências apontam que a falha na diferenciação pode estar associada à

utilização de células em fase S tardia/G₂ inicial do ciclo celular, enquanto que o sucesso na mudança fenotípica está associado a células em fase G₁/S inicial do ciclo celular (Dooner et al., 2008). A entrada e progressão da célula no ciclo celular são dependentes da exposição a citocinas. A mudança de fase do ciclo celular está associada a uma mudança na constituição da cromatina, que determina o possível acesso dos fatores de transcrição que acarretam na diferenciação destas células. Em determinadas fases do ciclo celular, quando a cromatina das células encontra-se em um estado permissivo, estas células são capazes de responder aos estímulos que levarão a mudança de seu fenótipo (Quesenberry et al., 2007). Células-tronco da medula óssea, quando expostas a citocinas *in vitro*, atravessam a fase G₁ e entram em fase S entre 18 e 20 horas, e a conclusão do ciclo celular e *population doubling* é observada entre 36 e 38 horas (Quesenberry et al., 2010). Espera-se, no entanto, que um grupo heterogêneo de células progenitoras, como o utilizado neste trabalho, contenha células em diferentes fases do ciclo celular e com sensibilidade variada aos estímulos externos.

A análise do ciclo celular das células não-aderentes foi realizada em todos os tempos de co-cultivo (resultados não apresentados) e mostrou que cerca de 80% das células encontrava-se em G₁ após 2 e 6 horas de co-cultivo, enquanto que após 24 horas, essa contagem era de cerca de 70%. Não houve diferença entre os grupos de co-cultivos (hepatócito normal e hepatócito lesionado). As células da fração aderente, no entanto, não foram analisadas quanto à fase no ciclo celular. Tampouco foram analisadas as células da FMMO microencapsuladas utilizadas no trabalho anterior do nosso grupo. É possível que a FMMO total tenha uma resposta diferente a estímulos externos ou até mesmo o processo de microencapsulação tenha favorecido a entrada destas células no ciclo celular precocemente em relação às células da fração não-aderente. Este efeito poderia explicar a diferença nos tempos observados nos dois trabalhos para a mudança no fenótipo das células.

Outro ponto importante a ser analisado são os mecanismos celulares envolvidos na diferenciação. A descoberta de pequenas vesículas liberadas por inúmeros tipos celulares deu início a uma nova era no entendimento da

transferência de sinalização e moléculas entre células. Diferentes nomenclaturas têm sido empregadas na descrição destes pequenos fragmentos recobertos por membrana, tais como exossomos ('*exosomes*'), microvesículas ('*microvesicles*'), micropartículas ('*microparticles*') e corpos apoptóticos ('*apoptotic bodies*') (Pap & Falus, 2009). O termo exossomo compreende vesículas pequenas, com tamanho entre 30 e 150 nm de diâmetro, derivadas da membrana luminal de corpos multivesiculares e constitutivamente liberadas por fusão com a membrana celular (Peinado et al., 2012). Microvesículas/micropartículas (MVs) são termos geralmente aplicados a um grupo heterogêneo de pequenas vesículas, com tamanho entre 100 e 1000 nm de diâmetro (Pap & Falus, 2009). Corpos apoptóticos são pequenas vesículas formadas apenas durante o processo de apoptose e possuem um tamanho maior (1 - 4 μm) em relação às MVs e exossomos (Hristov et al., 2004).

MVs apresentam uma extensa variedade de moléculas no seu interior e um padrão específico de moléculas de superfície semelhante às presentes na membrana da célula parental que as secreta (Pap & Falus, 2009). No presente estudo, mostramos a presença de MVs no sobrenadante das células não-aderentes da FMMO e hepatócitos com e sem lesão em cultivo, assim como após o co-cultivo destas células. Como esperado, o padrão de moléculas de superfície das MVs isoladas do sobrenadante das células não-aderentes em cultivo mostrou-se similar ao fenótipo observado nas células não-aderentes, mostrando que estas células também podem liberar MVs, como já foi descrito na literatura (Collino et al., 2010). Já a análise das MVs no sobrenadante do co-cultivo de células diferenciadas em células tipo-hepatócitos, mostrou uma porcentagem reduzida de MVs expressando CD45 (de cerca de 30% nas células não-aderentes cultivadas sozinhas para cerca de 15% após o co-cultivo), indicando a possível presença de MVs derivadas de hepatócitos. Outra evidência é a alta expressão de CD29 nas MVs analisadas. Em torno de 20% das MVs isoladas do sobrenadante do co-cultivo das células diferenciadas em células tipo-hepatócitos expressavam CD29. A presença de CD29 (*β 1-integrin*) parece ser um importante marcador de MVs, e já foi demonstrada em MVs derivadas de hepatócitos de rato (Conde-Vancells et al., 2008). No entanto, não dispúnhamos de marcadores de

membrana exclusivos de hepatócitos para fazer a confirmação da origem das MVs presentes no sobrenadante do co-cultivo após a diferenciação em células tipo-hepatócitos.

Outro fator importante na análise do conteúdo das MVs é o método de isolamento empregado. É largamente aceito que MVs podem ser isoladas do sobrenadante livre de células através da ultracentrifugação a 100.000 g por períodos de 20 a 60 minutos (Pap & Falus, 2009), que corresponde ao método utilizado neste trabalho. O isolamento de vesículas menores que 100 nm, ou exosomos, entretanto, necessita de ultracentrifugação com gradiente de sucrose. É importante ressaltar que o sobrenadante utilizado para isolamento das MVs após o co-cultivo foi coletado da câmara superior, que no nosso modelo está isolada da câmara inferior (onde se encontram os hepatócitos) por uma membrana semi-permeável com poros de 0,4 μm (**Figura 6**). Portanto, as MVs detectadas na câmara superior, se originadas de hepatócitos, possuem diâmetro inferior a 400 nm.

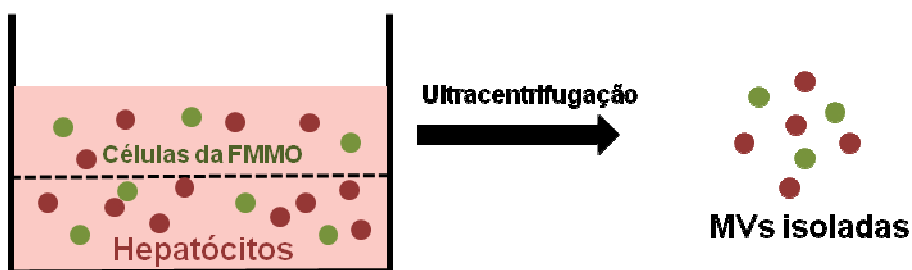


Figura 6. Representação do esquema de co-cultivo e isolamento das MVs. Na câmara superior encontram-se as células da FMMO co-cultivadas com hepatócitos (câmara inferior) separadas por uma membrana semi-permeável com poros de 0,4 μm . O modelo permite a difusão das MVs derivadas de hepatócitos (em vermelho) e da FMMO (em verde) entre as câmaras.

O conteúdo das vesículas varia de acordo com o tipo de vesícula e célula de origem. Já foi mostrado o transporte de material genético como DNA, mRNA e microRNA. Em alguns casos, foi sugerido que a informação genética carregada

pelas vesículas apresenta um padrão específico e não é resultado de um processo totalmente aleatório, especialmente diferente quando se compara as MVs liberadas pelo tecido sadio e lesionado (Quesenberry & Aliotta, 2010). A interação das MVs com as células alvo parece impactar diretamente nas características fenotípicas e funcionais dessas células, e pode ocorrer por diferentes mecanismos. A plasticidade observada pode ser devido à transferência de fatores de crescimento, receptores de superfície de membrana, reprogramação epigenética pela incorporação de material genético e/ou fatores de transcrição (Ratajzack, 2006).

Aliotta e colaboradores (2007) mostraram a liberação, por células do tecido pulmonar lesionado, de MVs contendo RNA específico de células epiteliais pulmonares. Estas MVs eram incorporadas por células da medula óssea e estimulavam a expressão de genes e proteínas específicas de pulmão. Resultados semelhantes foram obtidos através do co-cultivo de células da medula óssea e fragmentos de tecido hepático, cardíaco e cerebral lesionados (Aliotta et al., 2010).

Em nosso estudo, verificamos a presença de material genético nas MVs e, interessantemente, a presença de mRNA de albumina no sobrenadante das células diferenciadas em células tipo-hepatócitos, evento já descrito anteriormente por Aliotta e colaboradores (2010). A expressão dos marcadores hepáticos *Albumina* e *Ck-18* detectada nas células tipo-hepatócitos pode indicar a captura das MVs contendo mRNA por estas células, ao invés da reprogramação e indução da expressão gênica destas células. Uma forma de avaliar a origem do mRNA e a verdadeira reprogramação celular seria através da utilização de células de diferentes espécies no co-cultivo. Assim seria possível analisar a presença de mRNA com *primers* espécie-específicos. Esta metodologia foi utilizada por Aliotta e colaboradores (2010), que realizaram co-cultivos híbridos de rato e camundongo com fragmentos de fígado lesionados e células da medula óssea. O resultado mostrou que células da medula óssea de ratos co-cultivadas com fígados de camundongos apresentavam mRNA de *Albumina* das duas espécies. O mesmo resultado foi observado quando células da medula óssea de camundongos foram co-cultivadas com fígados de ratos. Esses dados mostram a

transferência direta de mRNA, assim como a indução da transcrição de mRNA específico do tecido lesionado (Aliotta et al., 2010).

As MVs derivadas do tecido lesionado podem mediar a mudança no fenótipo de células da medula óssea, mas para isso é preciso que haja a correta interação das MVs com as células alvo. Células da medula óssea expressam diferentes receptores de membrana que variam conforme o ciclo celular (Dooner et al., 2008). Por isso, tem sido sugerido que a fase do ciclo celular em que se encontram as células alvo pode afetar a facilidade com que as MVs são captadas (Quesenberry et al., 2010).

Além disso, o controle epigenético representa um mecanismo molecular importante na diferenciação das células. A diferenciação e proliferação de hepatócitos são reguladas predominantemente em nível de transcrição (Zaret et al., 2008). A expressão de genes eucarióticos é determinada pela ação combinada de diferentes fatores de transcrição, atuando em regiões regulatórias do DNA, e interação proteína-proteína, entre os fatores de transcrição e co-repressores/co-ativadores. Entretanto, o acesso à sequência alvo de DNA pelos fatores de transcrição e proteínas associadas requer uma conformação permissiva da cromatina que conduza à expressão gênica. A modulação dinâmica da arquitetura da cromatina através da metilação do DNA e/ou modificação covalente nas histonas representa a principal maquinaria para ativação e repressão transcricional (Snykers et al., 2009).

Células-tronco e células progenitoras possuem um perfil epigenético característico, o qual determina sua responsividade a sinais externos em diferentes estágios do desenvolvimento. Dessa forma, fatores de crescimento extracelulares podem afetar diretamente o status da cromatina, e por isso, estimular ou reprimir o potencial de diferenciação destas células (Zardo et al., 2008). Em geral, a acetilação de histonas está associada com ativação da transcrição, enquanto a metilação do DNA está associada com o silenciamento gênico. A revisão da literatura aponta que HDACi (*Histone Deacetylases inhibitor*; inibidores de histona desacetilase) e DNMTi (*DNA Methyltransferases inhibitor*; inibidores de DNA-metiltransferase) são potentes moduladores da função

hepática-específica, e, portanto, poderiam contribuir significativamente para a aquisição e manutenção do genótipo/fenótipo de células tipo hepatócitos *in vitro* (Snykers et al., 2009; Yamazaki et al., 2003).

A lesão tecidual pode causar inflamação liberando sinais, como citocinas, que induzem a diferenciação de células-tronco adultas. A maneira pela qual os sinais secretados pelo tecido lesionado são transformados em informação epigenética é desconhecida, mas parece estar envolvida com alterações na expressão de remodeladores cruciais de cromatina em resposta a estes sinais. A compreensão da plasticidade epigenética das células, que determina a habilidade das células de responder a sinais de injúria, é um importante passo para o desenvolvimento de estratégias para estimular a regeneração de tecidos e órgãos lesionados em humanos (Barreto & Belmonte, 2011). A influência do controle epigenético na diferenciação observada em nosso trabalho não foi testada, mas acreditamos ser um mecanismo importante cuja influência não pode ser descartada nos resultados obtidos.

5. Conclusões

Foi possível estabelecer que, nas condições utilizadas, células não-aderentes da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) foram capazes de se diferenciar em células tipo-hepatócitos apenas quando cultivadas com hepatócitos lesionados.

A caracterização das subpopulações da FMMO mostrou que as células aderentes e não-aderentes eram constituídas por populações heterogêneas logo após a separação das frações. A manutenção das células não-aderentes em cultivo favorece a permanência de células CD45⁺, enquanto que as células aderentes apresentam características de CTM após 3 passagens em cultura.

Foi observado que as células não-aderentes da FMMO são capazes de se diferenciar em células tipo-hepatócitos após 24 horas de co-cultivo com hepatócitos isolados de animais com lesão por CCl₄, apresentando expressão gênica de *Albumina* e *Citokeratina 18*, assim como produção de uréia.

A presença de microvesículas transportando material genético no meio de co-cultivo pode ter um importante papel no evento de diferenciação aqui observado.

6. Referências

- Al Battah, F., De Kock, J., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2011). Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1568–81. doi:10.1100/tsw.2011.146
- Aliotta, J. M., Sanchez-Guijo, F. M., Dooner, G. J., Johnson, K. W., Dooner, M. S., Greer, K. A., Greer, D., Pimentel, J., Kolankiewicz, L. M., Puente, N., Faraday, S., Ferland, P., Bearer, E. L., Passero, M. A., Adedi, M., Colvim, G. A. & Quesenberry, P. J. (2007). Alteration of Marrow Cell Gene Expression, Protein Production, and Engraftment into Lung by Lung-Derived Microvesicles: A Novel Mechanism for Phenotype Modulation. *Stem Cells*, 25, 2245–56. doi: 10.1634/stemcells.2007-0128
- Aliotta, J. M., Pereira, M., Johnson, K. W., de Paz, N., Dooner, M. S., Puente, N., ... Quesenberry, P. J. (2010). Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Experimental hematology*, 38(3), 233–45. doi:10.1016/j.exphem.2010.01.002
- Alison, M.R., Islam, S., Lim, S. (2009). Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol*, 217, 282–98.
- Almeida-Porada, G., Zanjani, E. D. & Porada, C. D. (2010) Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Exp Hematol*, 38(7), 574-80.
- Amer, M., El-Sayed, S., El-Kheir, W., Gabr, H., & Gomaa, A. (2011). Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23(10), 936–41.
- Ayatollahi, M., Soleimani, M., Tabei, S. Z., & Kabir Salmani, M. (2011). Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. *World journal of stem cells*, 3(12), 113–21. doi:10.4252/wjsc.v3.i12.113
- Baldo, G., Giugliani, R., Uribe, C., Belardinelli, M. C., Duarte, M. E. S., Meurer, L., ... Matte, U. (2010). Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl(4) acute liver damage. *Digestive diseases and sciences*, 55(12), 3384–92. doi:10.1007/s10620-010-1195-4
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H. & Ochiya, T. (2007) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Source of Human Hepatocytes. *Hepatology*, 46(1), 219-28. doi 10.1002/hep.21704

- Barreto, M. J. & Belmonte, J. C. I. (2011). Regenerating the epigenome. *EMBO reports*, 12(3), 208–15. doi:10.1038/embor.2011.10
- Belardinelli, M. C., Pereira, F., Baldo, G., Vicente Tavares, A. M., Kieling, C. O., da Silveira, T. R., ... Matte, U. (2008). Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*, 247(1), 1–5. doi:10.1016/j.tox.2008.01.015
- Berry, P.A., Antoniades, C. G., Hussain, M. J., McPhail, M. J., Bernal, W. & Vergani, D. (2010). Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int*, 30(5), 733–40.
- Braga, L. M. G., Lacchini, S., Schaan, B. D'A., Rodrigues, B., Rosa, K., De A., K., Borges, L. F., Irigoyen, M. C. & Nardi, N. B. (2008). In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *J Biomed Sci* doi 10.1007/s11373-008-9237-z
- Cai, Y., Zhen, Z., Min, J., Fang, T., Chu, Z., & Chen, J. (2004). Selection , proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum in vitro. *World J Gastroenterol*, 10(22), 3308–12.
- Chen, Y., Dong, X., Zhang, G., Shao, J., & Xiang, L. (2007). In Vitro Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Stem Cells Into Hepatocytes Induced by Conditioned Culture Medium of Hepatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 52–63. doi:10.1002/jcb.21275
- Choi, D., Kim, J. H., Lim, M., Song, K. W., Paik, S. S., Kim, S. J., ... Won, J.-H. (2008). Hepatocyte-like cells from human mesenchymal stem cells engrafted in regenerating rat liver tracked with in vivo magnetic resonance imaging. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 14(1), 15–23. doi:10.1089/tec.2007.0329
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., ... Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS one*, 5(7), e11803. doi:10.1371/journal.pone.0011803
- Conde-vancells, J., Rodriguez-suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., ... Falcon-perez, J. M. (2008). Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocyte. *Journal of Proteome Research*, 7, 5157–66.
- Couto, B., Goldenberg, R., da Fonseca, L., Thomas, J., Gutfilen, B., Resende, C., ... All, E. (2011). Bone marrow mononuclear cell therapy for patients with cirrhosis: a Phase 1 study. *Liver International*, 31(3), 391–400.

- Da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., & Nardi, N. B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2287–99. doi:10.1634/stemcells.2007-1122
- Dahlke, M. H., Popp, F. C., Larsen, S., Schlitt, H. J., & Rasko, J. E. J. (2004). Stem Cell Therapy of the Liver — Fusion or Fiction? *Liver Transplantation* 10(4), 471–9. doi:10.1002/lt.20121
- Dong, X., Pan, R., Zhang, H., Yang, C., Shao, J., & Xiang, L. (2013). Modification of histone acetylation facilitates hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PloS one*, 8(5), e63405. doi:10.1371/journal.pone.0063405
- Dooner, M. S., Aliotta, J. M., Pimentel, J., Dooner, G. J., Abedi, M., Colvin, G., ... Quesenberry, P. J. (2008). Conversion Potential of Marrow Cells into Lung Cells Fluctuates with Cytokine-Induced Cell Cycle. *Stem Cells and Development*, 17, 207–19. doi:10.1089/scd.2007.0195
- Dubuc, V., Moore, D. F., Gioia, L. C., Saposnik, G., Selchen, D., & Lanthier, S. (2012). Prevalence of Fabry Disease in Young Patients with Cryptogenic Ischemic Stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases* □: the official journal of National Stroke Association, 1–5. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.10.005
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, 137(2), 466–81. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.044
- Ehninger, A., & Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*, 208(3), 421–8. doi:10.1084/jem.20110132
- Ferreira, C. T., Vieira, S. M. G., Kieling, C. O. & Silveira, T. R. (2008). Hepatitis A acute liver failure: follow-up of paediatric patients in southern Brazil. *Journal of Viral Hepatitis*, 15(Suppl. 2), 66–8.
- Filipponi, F. & Mosca, F. (2001). Animal models of fulminant hepatic failure: need to test liver support devices. *Dig Liver Dis*, 33(7), 607-13.
- Forbes S. J. & Newsome P. N. (2012). New horizons for stem cell therapy in liver disease. *Journal of Hepatology*, 56, 496-9.
- Friedman, S. L., & Arthur, M. J. P. (2002). Reverting Hepatic Fibrosis. *Science & Medicine*, 194-205.
- Gavaghan, H. (2001). News Features: The promise of stem cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), 800–1.

- Gilchrist, E. S. & Plevris, J. N. (2010). Bone Marrow-Derived Stem Cells in Liver Repair: 10 Years Down the Line. *Liver Transplantation*, *16*, 118-29. doi 10.1002/lt.21965
- Grau, V., Scriba, a, Stehling, O., & Steiniger, B. (2000). Monocytes in the rat. *Immunobiology*, *202*(1), 94–103. doi:10.1016/S0171-2985(00)80056-X
- Harb, R., Xie, G., Lutzko, C., Guo, Y., Wang, X., Hill, C. K., Kanel, G. C. & Deleve, L. D. (2009). Bone Marrow Progenitor Cells Repair Rat Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells After Liver Injury. *Gastroenterology*, *137*, 704–12.
- Harting, M.T., Jimenez, F., Pati, S., Baumgartner, J., Cox, C.S. (2008) Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, *10*(3), 243-53.
- Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., ... Fukuda, K. (2005). Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovascular research*, *65*(2), 334–44. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.004
- Heng, B. C., Yu, H., Yin, Y., Lim, S. G. E. E., & Cao, T. (2005). Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *20*, 975–87. doi: 10.1111/j.1400-1746.2005.03856.x
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, *104*(9), 2761–6. doi:10.1182/blood-2003-10-3614
- Hsu, P., & Qu, C.-K. (2013). Metabolic plasticity and hematopoietic stem cell biology. *Current opinion in hematology*, *20*(4), 289–94. doi:10.1097/MOH.0b013e328360ab4d
- Hwang, S., Hong, H.-N., Kim, H.-S., Park, S.-R., Won, Y.-J., Choi, S.-T., ... Lee, S.-G. (2012). Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Cell biology international*, *36*(3), 279–88. doi:10.1042/CBI20110325
- Jang, Y.-Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M. & Sharkis, S. J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature Cell Biology*, *6*(6), 532-9. doi: 10.1038/ncb1132
- Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyaci, A. E., Kaymaz, F. & Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*, *132*, 533–46. doi 10.1007/s00418-009-0629-6

- Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., ... Tsuboi, K. (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction, *104*(12), 3581–7. doi:10.1182/blood-2004-04-1488.
- Kieling, C. O. (2012). Terapia celular na insuficiência hepática aguda: estudo experimental com células microencapsuladas. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor.
- Khan, S. A., Shah, N., Williams, R. & Jalan, R. (2006). Acute Liver Failure: a Review. *Clin Liver Dis*, *10*, 239–58.
- Kobayashi, N., Okitsu, T. & Tanaka, N. (2003). Cell choice for bioartificial liver. *Keio J Med*, *52*(3), 151-7.
- Kung, J. W. C. & Forbes, S. J. (2009). Stem cells and liver repair. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*, 568–74
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., ... Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*, *6*(11), 1229–34. doi:10.1038/81326
- Lagranha, V. L., Baldo, G., Giacomet de Carvalho, T., Burin, M., Saraiva-Pereira, M. L., Matte, U., & Giugliani, R. (2008). In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from Metachromatic Leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*, *23*, 469–84. doi:10.1007/s11011-008-9107-4
- Lam, S. P., Luk, J. M., Man, K., Ng, K. T. P., Cheung, C. K., Rose-John, S. & Lo, C. M. (2010). Activation of Interleukin-6–Induced Glycoprotein 130/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway in Mesenchymal Stem Cells Enhances Hepatic Differentiation, Proliferation, and Liver Regeneration. *Liver Transplantation*, *16*, 1195-206. doi 10.1002/lt.22136
- Lange, C., Bassler, P., Lioznov, M. V., Bruns, H., Kluth, D., Zander, A. R. & Fiegel, H. C. Hepatocytic Gene Expression in Cultured Rat Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Proceedings*, *37*, 276–9. doi:10.1016/j.transproceed.2004.11.087
- Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., ... Lee, O. K. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, *40*, 1275-84. doi 10.1002/hep.20469
- Lee, W. M., Squires Jr., R. H., Nybert, S. L., Doo, E., & Hoofnagle, J. H. (2008) Acute Liver Failure: Summary of a Workshop. *Hepatology*, *47*(4), 1401-15.

- Lee, W. M., Stravitz, R. T., & Larson, A. M. (2012). Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology*, *55*(3), 965–7. doi:10.1002/hep.25551
- Lensch, M. W. (2012). An evolving model of hematopoietic stem cell functional identity. *Stem cell reviews*, *8*(2), 551–60. doi:10.1007/s12015-012-9347-x
- Li, Kim, Cho, Lee, & Suh. (2010). Therapeutic Potential of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiated with Growth-Factor-Free Coculture Method. *Tissue engineering. Part A*, *16*(8), 2649–59. doi:10.1089/ten.tea.2009.0814
- Li, L., Sharma, N., Chippada, U., Jiang, X., Schloss, R., Yarmush, M. L., & Langrana, N. a. (2008). Functional modulation of ES-derived hepatocyte lineage cells via substrate compliance alteration. *Annals of biomedical engineering*, *36*(5), 865–76. doi:10.1007/s10439-008-9458-3
- Liu, Z. C., & Chang, T. M. (2006). Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transplantation*, *12*, 566–72.
- Luk, J. M., Wang, P. P., Lee, C. K., Wang, J. H., & Fan, S. T. (2005). Hepatic potential of bone marrow stromal cells: Development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *Journal of Immunological Methods*, *305*, 39 – 47. doi:10.1016/j.jim.2005.07.006
- Maguire, T., Novik, E., Schloss, R., & Yarmush, M. (2005). Alginate-PLL Microencapsulation: Effect on the Differentiation of Embryonic Stem Cells Into Hepatocytes. doi:10.1002/bit
- Mayer, F. Q., Baldo, G., de Carvalho, T. G., Lagranha, V. L., Giugliani, R., & Matte, U. (2010). Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artificial organs*, *34*(5), 434–9. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00880.x
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. a, & McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5497), 1779–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099419>
- Michalopoulos, G. K. (2011). Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *43*(2), 173–9. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.014
- Muraca, M. (2011). Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian*

Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 43(3), 180–7. doi:10.1016/j.dld.2010.08.007

- Oberg, K. S., Vance, T. J., Hausman, G. J., & V, R. A. H. M. (2005). Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*, (2004), 49–56. doi:10.1007/s10616-004-3903-4
- Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., ... Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 500–4.
- Oh, S.-H., Witek, R. P., Bae, S.-H., Zheng, D., Jung, Y., Piscaglia, A. C., & Petersen, B. E. (2007). Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology*, 132(3), 1077–87. doi:10.1053/j.gastro.2007.01.001
- Otsuru, S., Gordon, P. L., Shimono, K., Jethva, R., Marino, R., Phillips, C. L., ... Horwitz, E. M. (2012). Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. *Blood*, 120(9), 1933–41. doi:10.1182/blood-2011-12-400085
- Pap, E., & Falus, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm. res.*, 58, 1–8. doi:10.1007/s00011-008-8210-
- Passos, C. C., Ferreira, A. O., Blazquez, F. J. H. & Guerra, R. R. (2010). Modelos experimentais para indução de cirrose hepática em animais: Revisão de literatura. *Revista Biotemas*, 23(2), 183-90.
- Park, C.-H., Bae, S. H., Kim, H. Y., Kim, J. K., Jung, E. S., Chun, H. J., ... Lee, Y. S. (2013). A pilot study of autologous CD34-depleted bone marrow mononuclear cell transplantation via the hepatic artery in five patients with liver failure. *Cytotherapy*, (January), 1–9. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.013
- Peinado, H., Alec, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-silva, B., Moreno-bueno, G., ... Kang, Y. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *Nature Medicine*, 18(6), 883-94. doi:10.1038/nm.2753
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, a K., Murase, N., ... Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5417), 1168–70.
- Phuc, P. V., Ngoc, V. B., Lam, D. H., Tam, N. T., Viet, P. Q. & Ngoc, P. K. (2012). Isolation of three important types of stem cells from the same samples of

banked umbilical cord blood. *Cell Tissue Bank*, 13, 341–51.
doi:10.1007/s10561-011-9262-4

Pilat, N., Unger, L., & Berlakovich, G. A. (2013). Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation. *International journal of hepatology*, 1-7.
doi:10.1155/2013/310612

Polson, J. & Lee, W. M. (2005). AASLD Position Paper: The Management of Acute Liver Failure. *Hepatology*, 41(5), 1179-97.

Pournasr, B., Mohamadnejad, M., & Bagheri, M. (2011). In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Archives of Iranian Medicine*, 14(4), 244–9.

Qihao, Z., Xigu, C., Guanghui, C., & Weiwei, Z. (2007). Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells. *DNA and cell biology*, 26(7), 497–503.
doi:10.1089/dna.2006.0562

Quesenberry, P. J., Colvin, G., Dooner, G., Dooner, M., Aliotta, J. M., & Johnson, K. (2007). The Stem Cell Continuum Cell Cycle, Injury, and Phenotypic Lability, 29, 20–9. doi:10.1196/annals.1392.016

Quesenberry, P. J., & Aliotta, J. M. (2010). Cellular phenotype switching and microvesicles. *Advanced drug delivery reviews*, 62(12), 1141–8.
doi:10.1016/j.addr.2010.06.001

Quesenberry, P. J., Dooner, M. S., & Aliotta, J. M. (2010). Stem cell plasticity revisited: the continuum marrow model and phenotypic changes mediated by microvesicles. *Experimental hematology*, 38(7), 581–92.
doi:10.1016/j.exphem.2010.03.021

Quintana-Bustamante, O., Alvarez-Barrientos, A., Kofman, A. V., Fabregat, I., Bueren, J. A., Theise, N. D. & Segovia, J. C. (2005). Hematopoietic Mobilization in Mice Increases the Presence of Bone Marrow–Derived Hepatocytes Via In Vivo Cell Fusion. *Hepatology*, 43, 108-16.

Quintana-Bustamante, O., Grueso, E., Garcia-Escudero, R., Arza, E., Alvarez-Barrientos, A., Fabregat, I., ... Segovia, J. C. (2012). Cell fusion reprogramming leads to a specific hepatic expression pattern during mouse bone marrow derived hepatocyte formation in vivo. *PloS one*, 7(3), e33945.
doi:10.1371/journal.pone.0033945

Ratajczak, M. Z. (2006). Microvesicles: from “dust to crown”. *Blood*, 108(9), 2885-6.

- Rodrigues, D., Reverbel, T., Matte, U., Group, T. S., & Hepatology, E. (2012). Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. *ARQGA*, (4), 291–5.
- Ruhnke, M., Ungefroren, H., Nussler, A., Martin, F., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J. G., Klapper, W., Ulrichs, K., Hutchinson, J. A., Soria, B., Parwaresch, R. M., Heeckt, P., Kremer, B. & Fandrich, F. (2005). Differentiation of In Vitro–Modified Human Peripheral Blood Monocytes Into Hepatocyte-like and Pancreatic Islet–like Cells. *Gastroenterology*, 128, 1774–86.
- Saito, T., Okumoto, K., Haga, H., Nishise, Y., Ishii, R., Sato, C., & Watanabe, H. (2011). Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev.*, 20(9), 1503–10.
- Sass, D. A. & Shakil, A. O. (2005). Fulminant Hepatic Failure. *Liver Transplantation*, 11(6), 594-605.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., ... Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106, 756–63.
- Schrepfer, S., Deuse, T., Lange, C., Katzenberg, R., Reichenspurner, H., Robbins, R. C., & Pelletier, M. P. (2007). Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, 16(1), 105–7. doi:10.1089/scd.2006.0041
- Schwindt, T. T., Barnabé, G. F. & Mello, L. E. A. M. (2005). Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocirurg* 16(1), 13-19.
- Seglen, P. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 13, 29–83.
- Sharma, A., Gokulchandran, N., Sane, H., Nagrajan, A., Paranjape, A., Kulkarni, P., ... Badhe, P. (2013). Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for autism: an open label proof of concept study. *Stem cells international*, 1-13. doi:10.1155/2013/623875
- Shiota, G., & Yasui, T. (2012). Progress in stem cell biology in regenerative medicine for liver disease. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 42(1), 15–21. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00874.x
- Shu, S. N., Wei, L., Wang, J.-H., Zhan, Y.-T., Chen, H.-S. & Wang, Y. (2004). Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal

- stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol*, 10(19), 2818-22.
- Snykers, S., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Lutun, A., Jiang, Y., Vander Heyden, Y., ... Rogiers, V. (2006). Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 94(2), 330–41; discussion 235–9. doi:10.1093/toxsci/kfl058
- Snykers, S., Henkens, T., De Rop, E., Vinken, M., Fraczek, J., De Kock, J., ... Vanhaecke, T. (2009). Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *Journal of hepatology*, 51(1), 187–211. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.009
- Soto-Gutierrez, A., Basma, H., Navarro-Alvarez, N., Uygun, B. E., Yarmush, M. L., Kobayashi, N., & Fox, I. J. (2008). Differentiating Stem Cells into Liver. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 149–64. doi:10.5661/bger-25-149
- Tai, C.-L., Liu, M.-Y., Yu, H.-C., Chiang, C.-C., Chiang, H., Suen, J.-H., ... Niu, D.-M. (2012). The use of high resolution melting analysis to detect Fabry mutations in heterozygous females via dry bloodspots. *Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry*, 413(3-4), 422–7. doi:10.1016/j.cca.2011.10.023
- Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), 836–47. doi:10.1038/nrm1489
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., & Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31(1), 235–40. doi:10.1002/hep.510310135
- Turksen, K. (2013). Adult stem cells and cardiac regeneration. *Stem cell reviews*, 9(5), 537–40. doi:10.1007/s12015-013-9448-1
- Uribe, C. C., López, M. L., Simon, L., Mayer, F. Q., Matte, U., Giugliani, R. (2013) Bone marrow-derived mononuclear cells differentiate into hepatocyte-like cells within few hours without fusion. *BMC Gastroenterology (submitted)*.
- van Poll, D., Parekkadan, B., Cho, C.H., Berthiaume, F., Nahmias, Y., Tilles, A.W., & Yarmush, M.L. (2008). Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology*, 47(5), 1634-43.
- Villanueva, S., Ewertz, E., Carrión, F., Tapia, A., Vergara, C., Céspedes, C., Sáez, P. J., Luz, P., Irrázabal, C., Carreño, J. E., Figueroa, F. & Vio, F. P. (2011).

Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clinical Science*, 121, 489–499. doi:10.1042/CS20110108

Vosough, M., Moslem, M., Pournasr, B., & Baharvand, H. (2011). Cell-based therapeutics for liver disorders. *British medical bulletin*, 100, 157–72. doi:10.1093/bmb/ldr031

Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, 33(2), 105–36. doi:10.1080/713611034

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*, 61(4), 364–70.

Yamazaki, Shintaro, Miki, K., Hasegawa, K., Sata, M., Takayama, T., & Makuuchi, M. (2003). Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *Journal of Hepatology*, 39(1), 17–23. doi:10.1016/S0168-8278(03)00150-8

Zardo, G., Cimino, G., & Nervi, C. (2008). Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming. *Leukemia*, 22(8), 1503–18. doi:10.1038/leu.2008.141

Zaret, K. S., Watts, J., Xu, J., Wandzioch, E., Smale, S. T., & Sekiya, T. (2008). Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 119–26. doi:10.1101/sqb.2008.73.040

7. Anexo

Artigo de co-autoria submetido ao periódico BMC Gastroenterology
(Manuscript ID: 2402150971121815)

**Bone marrow-derived mononuclear cells differentiate into
hepatocyte-like cells within few hours without fusion**

Carolina Uribe Cruz^{1,2}, Mónica Luján López^{1,2}, Laura Simon^{1,2}, Fabiana Quoos Mayer^{1,2}, Ursula Matte^{1,2}, Roberto Giugliani^{1,2,3}.

¹ Post-Graduation Program on Genetics and Molecular Biology,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Gene Therapy Center, Experimental Research Center, Hospital de
Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto
Alegre, RS, Brazil

Carolina Uribe Cruz – carolaurib10@yahoo.com.ar

Mónica Luján López - monicalujan.l@gmail.com

Laura Simon – laurasimon11@gmail.com

Fabiana Quoos Mayer - bimmayer@gmail.com

Ursula Matte – umatte@hcpa.ufrgs.br

Roberto Giugliani – rgiugliani@hcpa.ufrgs.br

Corresponding Author:

Ursula Matte

Gene Therapy Center

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre, RS

Zip Code: 90035-903

Fone: +55 51 3359 8841 / 8838

Fax: + 55 51 3359 8010

Email: umatte@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background: Cell therapy using bone marrow mononuclear cells (BMMC) has been shown as a potential treatment for many illnesses, such as liver diseases. BMMC can act by fusion with the host's cells, differentiation into hepatocyte-like cells and/or secretion of paracrine factors. Here, we used encapsulated BMMC in a model of Carbon Tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury to study *in vivo* and *in vitro* differentiation of BMMC.

Methods: Both *in vitro* and *in vivo* studies were conducted in Wistar rats submitted to CCl₄-induced acute liver injury. BMMC were isolated from the femur and tibia of Wistar rats by density gradient with Ficoll Histopaque and encapsulated in sodium alginate microcapsules. For *in vivo* experiments, animals received encapsulated BMMC 24 hours after CCl₄ administration and capsules were collected within 6, 24 and 48 hours (tCCl₄ group). For *in vitro* experiments, isolated hepatocytes from animals with CCl₄-induced liver injury were co-cultured with encapsulated BMMC for 6 h (cCCl₄ group). Control groups were not submitted to CCl₄ administration (tControl and cControl groups, respectively). The content of intracellular lipid droplets in hepatocytes was used to evaluate liver injury. BMMC differentiation was assessed by RT-PCR for hepatic genes and ability to produce and secrete urea. Statistical analysis was carried out using Student's *t* test.

Results: Liver damage was confirmed in CCl₄ treated animals by the presence of several intracellular lipid droplets in hepatocytes and the characteristic nutmeg aspect of the liver. Retrieved encapsulated BMMC from tCCl₄ group expressed hepatocyte markers, such as *Cytokeratin 18* and *Albumin* 48 hours after treatment. On the other hand, BMMC from cCCl₄ group showed *Albumin* expression 6 hours

after co-culture. Urea production was increased in BMMC from cCCl₄ group but not in cControl. BMMC from tControl or cControl groups did not express hepatocyte markers at any time point.

Conclusions: In this study we show that BMMC differentiate into hepatocyte-like cells in a short period of time both *in vivo* and *in vitro*. This differentiation is triggered by paracrine factors present only in injured liver.

Keywords: Bone marrow mononuclear cells, cell differentiation, paracrine effects, hepatocyte-like cells, acute liver failure

Background

Bone marrow mononuclear cells (BMMC) have emerged as potential candidates for cell therapy due to their ease of use. In models of acute liver failure, transplantation of these cells increase the survival rate (Baldo et al., 2010; Belardinelli et al., 2008). Furthermore, recent clinical trials have demonstrated that transplantation of these cells or their fractions improves the condition of patients with cirrhosis (Amer, El-Sayed, El-Kheir, Gabr, & Gomaa, 2011; Couto et al., 2011; Saito et al., 2011). Moreover, BMMC are characterized by their ability to differentiate into several functional mature cell types both *in vivo* and *in vitro*, including cardiomyocytes (Hattan et al., 2005; Kawada et al., 2004), endothelial cells [8](Dubuc et al., 2012), neurons (Mezey, Chandross, Harta, Maki, & McKercher, 2000; Woodbury, Schwarz, Prockop, & Black, 2000) and hepatocytes (Choi et al., 2008; Lagasse et al., 2000; Liu & Chang, 2006; S.-H. Oh et al., 2007; Quintana-Bustamante et al., 2012; Sato et al., 2005; Theise et al., 2000). In addition, many groups have developed protocols for the *in vitro* differentiation of bone marrow-derived cells into hepatocyte-like cells (Ayatollahi, Soleimani, Tabei, & Kabir Salmani, 2011; Cai et al., 2004; Chen, Dong, Zhang, Shao, & Xiang, 2007; Dong et al., 2013; K. D. Lee et al., 2004; Pournasr, Mohamadnejad, & Bagheri, 2011). Although bone marrow mononuclear fraction is used for *in vivo* transplantation, *in vitro* protocols usually work with mesenchymal stem cells (MSC) (Ayatollahi et al., 2011; Dong et al., 2013; K. D. Lee et al., 2004; S. H. Oh et al., 2000).

Microencapsulation provides a vehicle for the discrete control of key parameters such as the diffusion of growth factors, metabolites, and wastes. It has been demonstrated that the alginate microenvironment maintains cell viability, is conducive to embryonic stem cell differentiation into hepatocytes, and maintains differentiated cellular function (Maguire, Novik, Schloss, & Yarmush, 2005). In addition, encapsulated bone marrow cells showed evidence of glycogen synthesis and expression of typical markers of hepatocytes, after transplantation in the 90% liver failure model (Liu & Chang, 2006; Tai et al., 2012). In the present work we used semi-permeable alginate microcapsules to isolate BMMC in a model of Carbon Tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury. Alginate microcapsules isolate BMMC and allow the study of *in vivo* and *in vitro* differentiation through paracrine factors. Cells were analyzed at short periods of time in order to investigate early reprogramming events.

Methods

Experimental design

Both *in vitro* and *in vivo* studies were conducted in Wistar rats submitted to CCl₄-induced acute liver injury. For *in vivo* studies, encapsulated BMMC were transplanted into animals with or without liver injury by CCl₄ and kept for 48 hours. For *in vitro* studies the encapsulated BMMC were co-cultured with hepatocytes isolated from rats with CCl₄-induced acute liver injury or without liver damage for 6 hours (figure 1).

Animals

Adult male Wistar rats weighing 200 to 250gr were kept under 24 hour light/dark cycles and fed standard chow and water *ad libitum*. Animals were sacrificed in the CO₂ chamber either 6, 24 or 48 hours after CCl₄ administration for *in vivo* studies (n= 3/time point). For *in vitro* studies, animals (n=3) were submitted to hepatocyte isolation 24 hours after CCl₄ administration. Control animals (n=12, 9 and 3 for *in vivo* and *in vitro* studies, respectively) were submitted to the same procedures but receiving vehicle instead of CCl₄. Bone marrow donors (n=9, 6 and 3 for *in vivo* and *in vitro* studies, respectively) were rats not submitted to any other procedure. This study was approved by the Ethics Research Committee and national guidelines for animal care were followed.

Acute liver injury model

Acute liver injury was induced by a single CCl₄ (VETEC, Brazil) dose of 1.25 ml/kg diluted in olive oil (Baldo et al., 2010). A final volume of 1 ml was administered by gavage. Control animals received only olive oil by gavage.

Isolation of bone marrow mononuclear cells (BMMC)

BMMC were isolated from the femur and tibia of Wistar rats, as previously reported (Belardinelli et al., 2008). Briefly, bone marrow was flushed with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LGC, Brazil) supplemented with 10%

Fetal Bovine Serum (FBS-Gibco, USA) and 1% Penicillin/Streptomycin (P/S-Gibco, USA) and BMMC were separated onto a Ficoll Histopaque (GE-Healthcare, USA) layer.

BMMC encapsulation

BMMC were encapsulated in sodium alginate microcapsules under sterile conditions, using the protocol described by our group (Lagranha et al., 2008; Mayer et al., 2010). BMMC were mixed with 1.5% sodium alginate (Sigma-Aldrich, USA) in DMEM and extruded through an encapsulation unit, type J1 (Nisco, Zurich, Switzerland), attached to a syringe pump (JMS, Singapore). Droplets were sheared off with an air flow of 5 L/min delivered to the tip of a 27-G needle and the rate of infusion was 40 mL/h. The droplets fell into a bath of 125 mM CaCl₂ and ionically cross-linked with Ca₂⁺ to form solid spherical hydrogel beads containing embedded cells. For *in vitro* experiment, in each well, beads were produced from a volume of 100 µL of alginate suspension, containing 1x10⁵ of BMMC. The resulting beads were maintained under normal tissue culture conditions: DMEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours prior to administration. For *in vivo* experiment, in each well, beads were produced from a volume of 2 mL of alginate suspension, containing 1x10⁶ BMMC/animal.

Capsules transplantation

For *in vivo* experiments, 24 hours after CCl₄ administration animals were anesthetized with inhaled isoflurane and a small incision was made in the abdomen. A total of 1×10^6 encapsulated BMMC suspended in 2 mL saline buffer was placed in the peritoneal cavity (tCCl₄ group, n=3/time). The same procedure was performed in animals without liver injury (tControl group, n=3/time). Sacrifice was performed in CO₂ chambers 6, 24 or 48 hours after capsules transplantation. Capsules were retrieved by washing the peritoneal cavity with Phosphate Buffered Saline (PBS).

Hepatocyte isolation

For *in vitro* studies hepatocytes were isolated 24 hours after CCl₄ using the modified 2-step perfusion method as previously described (Rodrigues, Reverbel, Matte, Group, & Hepatology, 2012; Seglen, 1976). Hepatocytes from animals without liver injury were isolated by the same method. Cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 10% FBS and 1% P/S (Invitrogen, USA) in tissue culture flasks for 24 hours prior to co-culture experiments.

In vitro co-culture

Encapsulated BMMC (1×10^5) were co-cultured with hepatocytes (3×10^6) from rats with CCl₄-induced liver injury (cCCl₄ group, n=3) and controls (cControl group, n=3). In addition to the capsules, both cell types were separated by a semipermeable transwell membrane (70 μ m filter; BD,

USA) placing the hepatocytes in the lower side and the BMMC in the upper side of the transwell. The cells were co-cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S for 6 h.

Intracellular lipid droplets

To evaluate the liver injury, cultured hepatocytes were stained with Oil Red O (ORO, MP Biomedicals, USA) to identify intracellular lipid droplets (ILD). Hepatocytes were fixed with formalin. After washing, 1 mL of 100% PEG (Ineos, Germany) was added for 2 min, and ORO /PEG (0.5 %) was added for 10 min. After that, cells were rinsed in 60% PEG for 1 min and washed. Hepatocytes were counter-stained with hematoxylin and observed under light microscope immediately (Oberge, Vance, Hausman, & V, 2005).

Urea quantification

After co-culture, encapsulated BMMC were removed from hepatocyte contact, washed with PBS and placed in fresh medium for 2 h. The medium was collected and urea was quantified by QuantiChrom™ Urea Assay Kit (DIUR-500, BioAssay Systems, USA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Encapsulated BMMC recovered from *in vivo* and *in vitro* experiments were dissolved using a 100-mM sodium citrate (Labsynth, Brazil) solution prior to RNA extraction. Total RNA was extracted using the RNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Germany), and reverse transcription (RT) was carried out with 1 µg of RNA. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using Superscript II RNA-reverse transcriptase (Invitrogen, USA).

For the RT-PCR, 2 µL cDNA-template were mixed with 5 µL PCR-buffer, 1.5 mM µl MgCl₂, 10 mMol dNTPs, 20 pmol of each primer, and 2U Taq DNA polymerase in a total volume of 50 µL. All reagents were from Invitrogen (USA). PCR was carried out using primers and conditions showed in Table 1. Samples were analyzed on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Statistical comparison of urea levels of the cControl and cCCl₄ groups was carried out using Student's *t* test, using the SPSS v.18. The level accepted for significance was $p < 0.05$.

Results

In vivo experiments

In order to study BMMC differentiation, encapsulated cells were implanted in the peritoneal cavity of Wistar rats 24 hours after CCl₄ or olive oil

administration. In animals from tCCl₄ group, liver injury was confirmed at the time of surgery by the characteristic nutmeg aspect of the liver.

Animals were sacrificed in CO₂ chamber after 6, 24 or 48 h and capsules were retrieved from the peritoneum.

Gene expression pattern was markedly different in BMMC from tCCl₄ retrieved after 48 hours, showing the expression of hepatocyte markers such as *Albumin* and *Cytokeratin 18*, but negative for *Alfa-fetoprotein* (figure 2). On the other hand, BMMC retrieved at 6 or 24 hours after injection were negative for all markers but *Gapdh*. Interestingly, BMMC from tControl group at all time points were also negative for all markers, except for the internal control (*Gapdh*), showing an expression pattern similar to that of naïve BMMC.

In vitro experiments

Since encapsulated BMMC showed the expression of hepatocyte markers 48 h after implantation in animals with CCl₄-induced acute liver injury, we tried to replicate the same model *in vitro* in order to determine when this reprogramming takes place.

As a way to assess hepatocyte damage in this model, cells isolated from animals with or without liver injury were stained with oil red. In CCl₄ treated animals, several intracellular lipid droplets could be observed, that were absent in control animals.

Encapsulated BMMC that were in co-culture with hepatocytes from CCl₄ treated animals for only six hours showed *Albumin* expression, whereas those in contact with control hepatocytes were negative (figure 3). No expression of *Ck18* or *Afp* was detected.

In order to determine if this reprogramming also had functional repercussion in BMMC we tested urea production by these cells. After co-culture with hepatocytes, encapsulated BMMC were kept for other 2 h in culture, with fresh medium. Urea production was greatly increased in BMMC from cCCl₄ group (figure 4) as compared to cControl group. However, it was lower than the amount produced by hepatocytes in culture (5.85 mg/dL).

Discussion

The ability of BMMC to differentiate into hepatocyte-like cells has been shown both *in vivo* and *in vitro* by different groups. In the present study we have shown that BMMC are able to express hepatocyte-specific genes after only 6 hours of co-culture with hepatocytes from CCl₄ treated animals. *In vivo*, these cells take 48 hours to express the same genes. *In vitro* differentiation is usually obtained by the use of growth factors, especially Hepatocyte Growth Factor (HGF), although quite a number of differences exist between protocols (Ayatollahi et al., 2011; Dong et al., 2013; K. D. Lee et al., 2004; S. H. Oh et al., 2000). Some authors have shown differentiation also with hepatocyte conditioned-medium (Chen et

al., 2007) or serum from patients with hepatitis B virus-associated liver cirrhosis (S Yamazaki et al., 2003), co-culture with hepatocytes (Li, Kim, Cho, Lee, & Suh, 2010; Li et al., 2008; Qihao, Xigu, Guanghui, & Weiwei, 2007) or liver fragments (Luk et al., 2005) from healthy or injured animals. However, unlike the present study, the above mentioned groups use MSC and not BMMC. Even though MSC have a well known differentiation capacity, their isolation, culture and expansion are time consuming processes. On the other hand, BMMC are readily available, and do not need a culture step prior to administration.

Our results show that BMMC co-cultured with injured hepatocytes for six hours show expression of *Albumin* and urea production. Changes in gene expression at early times like this are not reported by studies with MSC that usually differentiate after 3 to 40 days in culture (Pournasr et al., 2011; Qihao et al., 2007). In contrast, when BMMC were co-cultured with hepatocytes isolated from healthy animals, no *Albumin* expression or urea production was detected after 6 hours. Other reports have shown differentiation of MSC even after co-culture with healthy hepatocytes (Qihao et al., 2007). These differences may be reconciled by intrinsic characteristics of the cell types used in this study or by the short period of time analyzed. It is possible that injured hepatocytes secrete paracrine factors that lead to BMMC reprogramming sooner than healthy hepatocytes (Muraca, 2011; Quesenberry & Aliotta, 2010).

Interestingly, *in vivo* differentiation occurred only after 48 hours. It is possible that *in vitro* hepatocytes secrete factors at higher concentrations,

thus inducing differentiation in shorter times. Several studies have shown the ability of BMMC to differentiate into hepatocyte-like *in vivo*. Most of these studies show the expression of *Alb* and *Afp* (Choi et al., 2008; Hwang et al., 2012; Lagasse et al., 2000; Sato et al., 2005; Theise et al., 2000), but also *Ck8* and *Ck18* (Liu & Chang, 2006). As in the previous studies, this differentiation occurs only when BMMC are transplanted into injured animals, suggesting that liver damage triggers the release of substances that modulate BMMC gene expression. However, unlike ours, other groups describe differentiation after 13 (Petersen et al., 1999) and 60 days (Lagasse et al., 2000; Theise et al., 2000).

There is still debate in the literature if these cells convert into hepatocyte-like by means of fusion or differentiation (Quintana-Bustamante et al., 2012). Our results favor the differentiation hypothesis, in accordance with other study that used microencapsulated cells (Liu & Chang, 2006). It cannot be ruled out, however, that fusion mechanisms do exist or play a role in cell-mediated tissue recovery after injury. Yet, in this work alginate microcapsules prevented any type of fusion between BMMC and hepatocytes, although allowing for the interchange of soluble compounds between these two cell types.

Conclusions

In summary, this work shows that BMMC are able to differentiate into hepatocyte-like cells in a short period of time both *in vivo* as *in vitro*. This differentiation occurs without fusion and is triggered by factors present only

in injured liver. The identification of such factors and of the cells in the mononuclear fraction that respond to them is under further investigation.

List of abbreviations

Afp, Alpha-fetoprotein; **Alb**, Albumin; **BMMC**, Bone Marrow Mononuclear Cells; **Ca²⁺**, Ion Calcium Ca²⁺; **CaCl₂**, Calcium Chloride; **cCCl₄**, Co-culture of BMMC with hepatocytes from CCl₄ treated rats; **CCl₄**, Carbon Tetrachloride; **cControl**, Co-culture of BMMC with hepatocytes from healthy rats, **CO₂**, Carbon dioxide; **Ck8**, Cytokeratin 8; **Ck18**, Cytokeratin 18; **DMEM**, Dulbecco's Modified Eagle Medium; **FBS**, Fetal Bovine Serum; **Gapdh**, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; **HGF**, Hepatocyte Growth Factor; **MSC**, Mesenchymal Stem Cells; **ORO**, Oil Red O; **PEG**, Polyethylene Glycol; **PBS**, Phosphate Buffered Saline; **P/S**, Penicilin/Streptomycin; **RT-PCR**, Reverse transcription-polymerase chain reaction; **tCCl₄**, Transplantation of BMMC in rats with CCl₄-induced liver damaged; **tControl**, Transplantation of BMMC in healthy rats.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

CUC participated in study design, conducted all experiments and drafted the manuscript. MLL took part in animal handling, hepatocytes isolation and BMMC encapsulation, and performed statistical analysis. LS carried out hepatocytes and

BMMC isolation, culture work and manuscript writing. FQM participated in BMMC encapsulation and transplantation. RG supported the study design. UM participated in the study design, coordination and writing the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by: Research Incentive Fund of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA No.08-695); The National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq), Fund for Research Support of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Program for Support of Centers of Excellence (PRONEX – FAPERGS/CNPq n. 008/2009).

References

- Al Battah, F., De Kock, J., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2011). Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1568–81. doi:10.1100/tsw.2011.146
- Aliotta, J. M., Pereira, M., Johnson, K. W., de Paz, N., Dooner, M. S., Puente, N., ... Quesenberry, P. J. (2010). Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Experimental hematology*, 38(3), 233–45. doi:10.1016/j.exphem.2010.01.002
- Amer, M., El-Sayed, S., El-Kheir, W., Gabr, H., & Gomaa, A. (2011). Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23(10), 936–41.
- Ayatollahi, M., Soleimani, M., Tabei, S. Z., & Kabir Salmani, M. (2011). Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. *World journal of stem cells*, 3(12), 113–21. doi:10.4252/wjsc.v3.i12.113
- Baldo, G., Giugliani, R., Uribe, C., Belardinelli, M. C., Duarte, M. E. S., Meurer, L., ... Matte, U. (2010). Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl(4) acute liver

damage. *Digestive diseases and sciences*, 55(12), 3384–92.
doi:10.1007/s10620-010-1195-4

- Belardinelli, M. C., Pereira, F., Baldo, G., Vicente Tavares, A. M., Kieling, C. O., da Silveira, T. R., ... Matte, U. (2008). Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology*, 247(1), 1–5. doi:10.1016/j.tox.2008.01.015
- Cai, Y., Zhen, Z., Min, J., Fang, T., Chu, Z., & Chen, J. (2004). Selection , proliferation and differentiation of bone marrow-derived liver stem cells with a culture system containing cholestatic serum in vitro. *World J Gastroenterol*, 10(22), 3308–3312.
- Chen, Y., Dong, X., Zhang, G., Shao, J., & Xiang, L. (2007). In Vitro Differentiation of Mouse Bone Marrow Stromal Stem Cells Into Hepatocytes Induced by Conditioned Culture Medium of Hepatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 52–63. doi:10.1002/jcb.21275
- Choi, D., Kim, J. H., Lim, M., Song, K. W., Paik, S. S., Kim, S. J., ... Won, J.-H. (2008). Hepatocyte-like cells from human mesenchymal stem cells engrafted in regenerating rat liver tracked with in vivo magnetic resonance imaging. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 14(1), 15–23.
doi:10.1089/tec.2007.0329
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., ... Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PloS one*, 5(7), e11803. doi:10.1371/journal.pone.0011803
- Conde-vancells, J., Rodriguez-suarez, E., Embade, N., Gil, D., Matthiesen, R., Valle, M., ... Falcon-perez, J. M. (2008). Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes research articles, 5157–5166.
- Couto, B., Goldenberg, R., da Fonseca, L., Thomas, J., Gutfilen, B., Resende, C., ... All, E. (2011). Bone marrow mononuclear cell therapy for patients with cirrhosis: a Phase 1 study. *Liver International*, 31(3), 391–400.
- Da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., & Nardi, N. B. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2287–99. doi:10.1634/stemcells.2007-1122
- Dahlke, M. H., Popp, F. C., Larsen, S., Schlitt, H. J., & Rasko, J. E. J. (2004). Stem Cell Therapy of the Liver — Fusion or Fiction? *Journal of Cellular Biochemistry*, 10(4), 471–479.
doi:10.1002/lt.20121
- Dc, W. (2013). Microvesicles: from “ dust to crown ”, 2885–2886.
doi:10.1182/blood-2006-08-041046

- Dong, X., Pan, R., Zhang, H., Yang, C., Shao, J., & Xiang, L. (2013). Modification of histone acetylation facilitates hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *PloS one*, *8*(5), e63405. doi:10.1371/journal.pone.0063405
- Dooner, M. S., Aliotta, J. M., Pimentel, J., Dooner, G. J., Abedi, M., Colvin, G., ... Quesenberry, P. J. (2008). Fluctuates with Cytokine-Induced Cell Cycle, *219*, 207–219. doi:10.1089/scd.2007.0195
- Dubuc, V., Moore, D. F., Gioia, L. C., Saposnik, G., Selchen, D., & Lanthier, S. (2012). Prevalence of Fabry Disease in Young Patients with Cryptogenic Ischemic Stroke. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases* □: *the official journal of National Stroke Association*, 1–5. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.10.005
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, *137*(2), 466–81. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.044
- Ehninger, A., & Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*, *208*(3), 421–8. doi:10.1084/jem.20110132
- Forbes, 2012 - New horizons for stem cell therapy in liver disease.pdf. (n.d.).
- Friedman, S. L., & Arthur, M. J. P. (n.d.). Hepatic Fibrosis.
- Gavaghan, H. (2001). News Features The promise of stem cells, *79*(8), 800–801.
- Grau, V., Scriba, a, Stehling, O., & Steiniger, B. (2000). Monocytes in the rat. *Immunobiology*, *202*(1), 94–103. doi:10.1016/S0171-2985(00)80056-X
- Harting, 2008 - Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells.pdf. (n.d.).
- Hattan, N., Kawaguchi, H., Ando, K., Kuwabara, E., Fujita, J., Murata, M., ... Fukuda, K. (2005). Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovascular research*, *65*(2), 334–44. doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.004
- Heng, B. C., Yu, H., Yin, Y., Lim, S. G. E. E., & Cao, T. (2005). Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro CULTURE MILIEU FOR DIRECTING THE HEPATIC DIFFERENTIATION, (August 2004), 975–987. doi:10.1111/j.1400-1746.2005.03856.x
- Hristov, M., Erl, W., Linder, S., & Weber, P. C. (2004). Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human

endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 104(9), 2761–6. doi:10.1182/blood-2003-10-3614

- Hsu, P., & Qu, C.-K. (2013). Metabolic plasticity and hematopoietic stem cell biology. *Current opinion in hematology*, 20(4), 289–94. doi:10.1097/MOH.0b013e328360ab4d
- Hwang, S., Hong, H.-N., Kim, H.-S., Park, S.-R., Won, Y.-J., Choi, S.-T., ... Lee, S.-G. (2012). Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Cell biology international*, 36(3), 279–88. doi:10.1042/CBI20110325
- Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., ... Tsuboi, K. (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction, 104(12), 3581–3587. doi:10.1182/blood-2004-04-1488.Supported
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., ... Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*, 6(11), 1229–34. doi:10.1038/81326
- Lagranha, V. L., Baldo, G., Giacomet de Carvalho, T., Burin, M., Saraiva-Pereira, M. L., Matte, U., & Giugliani, R. (2008). In vitro correction of ARSA deficiency in human skin fibroblasts from Metachromatic Leukodystrophy patients after treatment with microencapsulated recombinant cells. *Metab Brain Dis*, 23, 469–484. doi:10.1007/s11011-008-9107-4
- Lee, K. D., Kuo, T. K., Whang-peng, J., Chung, Y. F., Lin, C. T., Chou, S. H., ... Lee, O. K. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 401275.
- Lee, W. M., Stravitz, R. T., & Larson, A. M. (2012). Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Position Paper on acute liver failure 2011. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 55(3), 965–7. doi:10.1002/hep.25551
- Lensch, M. W. (2012). An evolving model of hematopoietic stem cell functional identity. *Stem cell reviews*, 8(2), 551–60. doi:10.1007/s12015-012-9347-x
- Li, Kim, Cho, Lee, & Suh. (2010). Therapeutic Potential of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiated with Growth-Factor-Free Coculture Method. *Tissue engineering. Part A*, 16(8), 2649–59. doi:10.1089/ten.tea.2009.0814
- Li, L., Sharma, N., Chippada, U., Jiang, X., Schloss, R., Yarmush, M. L., & Langrana, N. a. (2008). Functional modulation of ES-derived hepatocyte lineage cells via substrate compliance alteration. *Annals of biomedical engineering*, 36(5), 865–76. doi:10.1007/s10439-008-9458-3

- Liu, Z. C., & Chang, T. M. (2006). Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transplantation*, *12*, 566–572.
- Luk, J. M., Wang, P. P., Lee, C. K., Wang, J. H., & Fan, S. T. (2005). Hepatic potential of bone marrow stromal cells: Development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *Journal of Immunological Methods*, *305*, 39 – 47. doi:10.1016/j.jim.2005.07.006
- Maguire, T., Novik, E., Schloss, R., & Yarmush, M. (2005). Alginate-PLL Microencapsulation □: Effect on the Differentiation of Embryonic Stem Cells Into Hepatocytes. doi:10.1002/bit
- Mayer, F. Q., Baldo, G., de Carvalho, T. G., Lagranha, V. L., Giugliani, R., & Matte, U. (2010). Effects of cryopreservation and hypothermic storage on cell viability and enzyme activity in recombinant encapsulated cells overexpressing alpha-L-iduronidase. *Artificial organs*, *34*(5), 434–9. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00880.x
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. a, & McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5497), 1779–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099419>
- Michalopoulos, G. K. (2011). Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *43*(2), 173–9. doi:10.1016/j.biocel.2009.09.014
- Muraca, M. (2011). Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. *Digestive and liver disease □: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, *43*(3), 180–7. doi:10.1016/j.dld.2010.08.007
- Oberg, K. S., Vance, T. J., Hausman, G. J., & V, R. A. H. M. (2005). Oil red-O stains non-adipogenic cells: a precautionary note. *Cytotechnology*, (2004), 49–56. doi:10.1007/s10616-004-3903-4
- Oh, S. H., Miyazaki, M., Kouchi, H., Inoue, Y., Sakaguchi, M., Tsuji, T., ... Namba, M. (2000). Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *279*, 500–504.
- Oh, S.-H., Witek, R. P., Bae, S.-H., Zheng, D., Jung, Y., Piscaglia, A. C., & Petersen, B. E. (2007). Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology*, *132*(3), 1077–87. doi:10.1053/j.gastro.2007.01.001

- Otsuru, S., Gordon, P. L., Shimono, K., Jethva, R., Marino, R., Phillips, C. L., ... Horwitz, E. M. (2012). Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. *Blood*, *120*(9), 1933–41. doi:10.1182/blood-2011-12-400085
- Pap, E., & Falus, A. (2009). Review Highlights of a new type of intercellular communication□: microvesicle-based information transfer, *58*, 1–8. doi:10.1007/s00011-008-8210-
- Park, C.-H., Bae, S. H., Kim, H. Y., Kim, J. K., Jung, E. S., Chun, H. J., ... Lee, Y. S. (2013). A pilot study of autologous CD34-depleted bone marrow mononuclear cell transplantation via the hepatic artery in five patients with liver failure. *Cytotherapy*, (January), 1–9. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.013
- Peinado, H., Alec, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-silva, B., Moreno-bueno, G., ... Kang, Y. (2012). articles Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET, *18*(6). doi:10.1038/nm.2753
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, a K., Murase, N., ... Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5417), 1168–70.
- Phuc, P. Van, & Bich, V. (2012). Isolation of three important types of stem cells from the same samples of banked umbilical cord blood, 341–351. doi:10.1007/s10561-011-9262-4
- Pilat, N., Unger, L., & Berlakovich, G. a. (2013). Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation. *International journal of hepatology*, *2013*(Figure 1), 310612. doi:10.1155/2013/310612
- Pournasr, B., Mohamadnejad, M., & Bagheri, M. (2011). In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Archives of Iranian Medicine*, *14*(4), 244–249.
- Qihao, Z., Xigu, C., Guanghui, C., & Weiwei, Z. (2007). Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells. *DNA and cell biology*, *26*(7), 497–503. doi:10.1089/dna.2006.0562
- Quesenberry, P. J., & Aliotta, J. M. (2010). Cellular phenotype switching and microvesicles. *Advanced drug delivery reviews*, *62*(12), 1141–8. doi:10.1016/j.addr.2010.06.001

- Quesenberry, P. J., Colvin, G., Dooner, G., Dooner, M., Aliotta, J. M., & Johnson, K. (2007). The Stem Cell Continuum Cell Cycle , Injury , and Phenotype Lability, *29*, 20–29. doi:10.1196/annals.1392.016
- Quesenberry, P. J., Dooner, M. S., & Aliotta, J. M. (2010). Stem cell plasticity revisited: the continuum marrow model and phenotypic changes mediated by microvesicles. *Experimental hematology*, *38*(7), 581–92. doi:10.1016/j.exphem.2010.03.021
- Quintana-Bustamante, O., Grueso, E., Garcia-Escudero, R., Arza, E., Alvarez-Barrientos, A., Fabregat, I., ... Segovia, J. C. (2012). Cell fusion reprogramming leads to a specific hepatic expression pattern during mouse bone marrow derived hepatocyte formation in vivo. *PloS one*, *7*(3), e33945. doi:10.1371/journal.pone.0033945
- Rodrigues, D., Reverbel, T., Matte, U., Group, T. S., & Hepatology, E. (2012). Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. *ARQGA*, (4), 291–295.
- Saito, T., Okumoto, K., Haga, H., Nishise, Y., Ishii, R., Sato, C., & Watanabe, H. (2011). Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev.*, *20*(9), 1503–10.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., ... Niitsu, Y. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, *106*, 756–763.
- Schrepfer, S., Deuse, T., Lange, C., Katzenberg, R., Reichenspurner, H., Robbins, R. C., & Pelletier, M. P. (2007). Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*, *16*(1), 105–7. doi:10.1089/scd.2006.0041
- Seglen, P. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, *13*, 29–83.
- Sharma, A., Gokulchandran, N., Sane, H., Nagrajan, A., Paranjape, A., Kulkarni, P., ... Badhe, P. (2013). Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for autism: an open label proof of concept study. *Stem cells international*, *2013*, 623875. doi:10.1155/2013/623875
- Shiota, G., & Yasui, T. (2012). Progress in stem cell biology in regenerative medicine for liver disease. *Hepatology research*: the official journal of the Japan Society of Hepatology, *42*(1), 15–21. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00874.x
- Snykers, S., Henkens, T., De Rop, E., Vinken, M., Fraczek, J., De Kock, J., ... Vanhaecke, T. (2009). Role of epigenetics in liver-specific gene transcription,

hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *Journal of hepatology*, 51(1), 187–211. doi:10.1016/j.jhep.2009.03.009

Snykers, S., Vanhaecke, T., Papeleu, P., Lutun, A., Jiang, Y., Vander Heyden, Y., ... Rogiers, V. (2006). Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicological sciences*: an official journal of the Society of Toxicology, 94(2), 330–41; discussion 235–9. doi:10.1093/toxsci/kfl058

Soto-Gutierrez, A., Basma, H., Navarro-Alvarez, N., Uygun, B. E., Yarmush, M. L., Kobayashi, N., & Fox, I. J. (2008). Differentiating Stem Cells into Liver. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25(1), 149–164. doi:10.5661/bger-25-149

Tai, C.-L., Liu, M.-Y., Yu, H.-C., Chiang, C.-C., Chiang, H., Suen, J.-H., ... Niu, D.-M. (2012). The use of high resolution melting analysis to detect Fabry mutations in heterozygous females via dry bloodspots. *Clinica chimica acta international journal of clinical chemistry*, 413(3-4), 422–7. doi:10.1016/j.cca.2011.10.023

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10), 836–47. doi:10.1038/nrm1489

Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., & Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 31(1), 235–40. doi:10.1002/hep.510310135

Turksen, K. (2013). Adult stem cells and cardiac regeneration. *Stem cell reviews*, 9(5), 537–40. doi:10.1007/s12015-013-9448-1

van Poll, 2008 - Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo.pdf. (n.d.).

Vosough, M., Moslem, M., Pournasr, B., & Baharvand, H. (2011). Cell-based therapeutics for liver disorders. *British medical bulletin*, 100, 157–72. doi:10.1093/bmb/ldr031

Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical reviews in toxicology*, 33(2), 105–36. doi:10.1080/713611034

Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research*, 61(4), 364–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931522>

Yamazaki, S, Miki, K., Hasegawa, K., Sata, M., Takayama, T., & Makuuchi, M. (2003). Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol.*, 3917.

Yamazaki, Shintaro, Miki, K., Hasegawa, K., Sata, M., Takayama, T., & Makuuchi, M. (2003). Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *Journal of Hepatology*, 39(1), 17–23. doi:10.1016/S0168-8278(03)00150-8

Zardo, G., Cimino, G., & Nervi, C. (2008). Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming. *Leukemia*, 22(8), 1503–18. doi:10.1038/leu.2008.141

Zaret, K. S., Watts, J., Xu, J., Wandzioch, E., Smale, S. T., & Sekiya, T. (2008). Pioneer factors, genetic competence, and inductive signaling: programming liver and pancreas progenitors from the endoderm. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 73, 119–26. doi:10.1101/sqb.2008.73.040

Table 1 – Primers and amplification conditions used to analyze gene expression of BMMC.

Primer name	Sequence	PCR condition	Fragment length
<i>Alb</i>	For: 5'GGTATGAATATGCAAGAAG3' Rev: 5'CACTCTTCCCAGGTTTCTTG3'	48°C	350 bp
<i>Ck-18</i>	For: 5'GGACCTCAGCAAGATCATGGC3' Rev: 5'CCAGGATCTTACGGGTAGTTG3'	50°C	518 bp
<i>Afp</i>	For: 5'CCCACCCTTCCACTTTCCAGA3' Rev: 5'GCTGGAAGTGCCTTGTCATA3'	54°C	164 bp
<i>Gapdh</i>	For: 5'GAGTTGCTGTTGAAGTCACAGG3' Rev: 5'CAGCAATGCATCCTGCAC3'	42°C	429 bp

Alb, Albumin; *Ck-18*, Cytokeratin 18; *Afp*, Alpha-fetoprotein; *Gapdh*, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

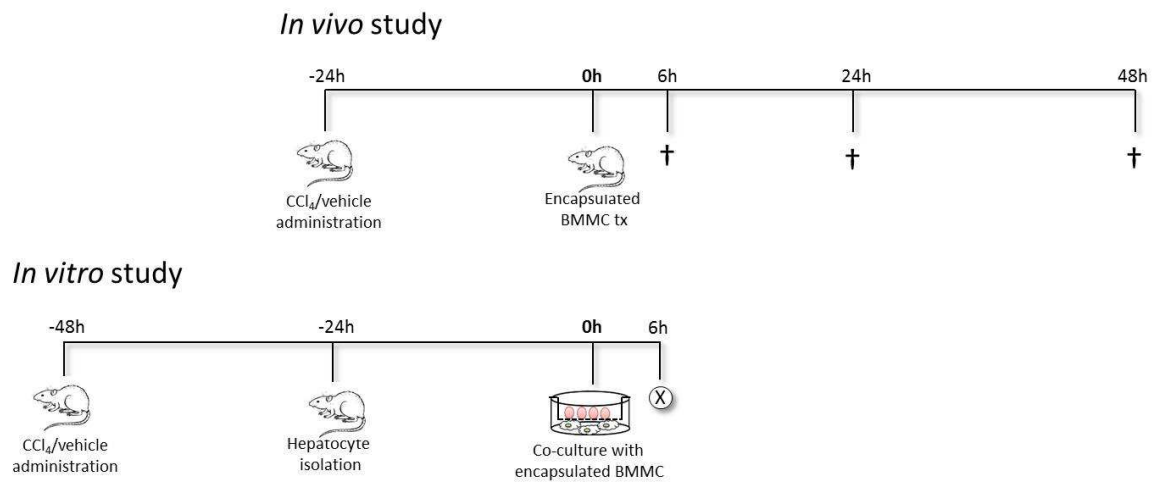


Figure 1: Experimental design of *in vivo* and *in vitro* studies. † Sacrifice of animals and retrieve of capsules; ⊗ Interruption of co-culture and recovery of encapsulated BMMC.

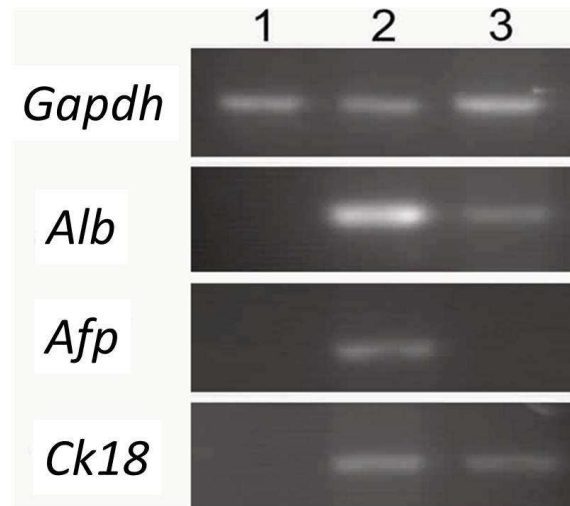


Figure 2: BMMC expression of hepatocyte markers 48 hours after implantation in animals with CCl₄-induced acute liver injury. RT-PCR analysis of gene expression in encapsulated BMMC from tControl (lane 1) or tCCl₄ (lane 3) retrieved 48 hours after implantation. Positive control (hepatocytes, lane 2).

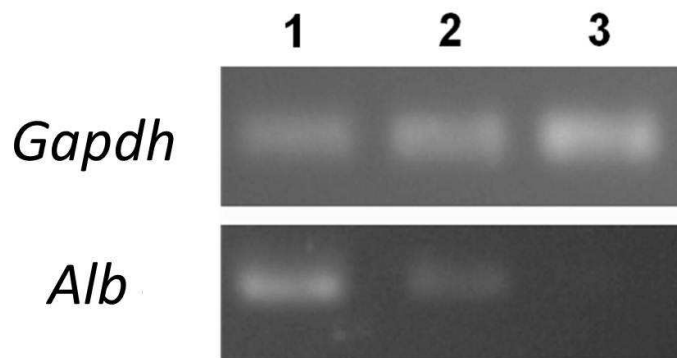


Figure 3: RT-PCR analysis of *Alb* gene expression in BMMC after 6 hour co-culture. Hepatocyte (positive control, lane 1). Encapsulated BMMC from cCCl₄ group (lane 2). Encapsulated BMMC from cControl group (lane 3). *Gapdh*: internal control.

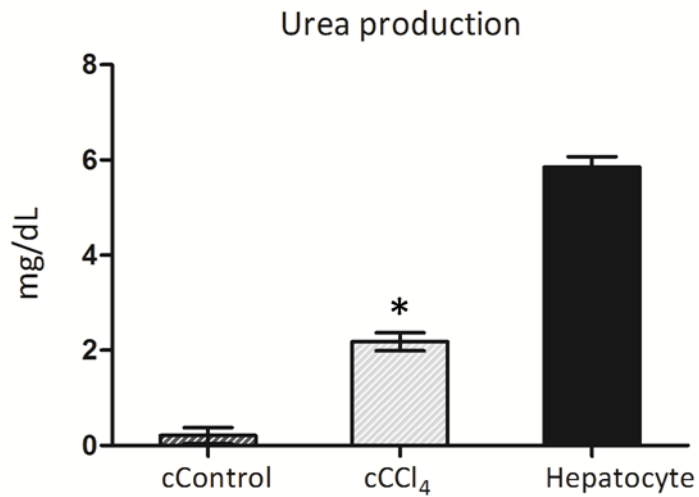


Figure 4: Quantification of urea production in the culture medium from encapsulated BMMC. Urea production was increased in BMMC from cCCl₄ group but not in cControl. Medium from hepatocyte culture was used as reference value. * $p = 0.033$ compared to cControl group (Student's *t* test).