

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS EM CÉLULAS  
TIPO-HEPATÓCITOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VIRGINIA ANDREA ANGIOLINI

Porto Alegre, Brasil

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E  
DO ADOLESCENTE

**DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS EM CÉLULAS  
TIPO-HEPATÓCITOS**

VIRGINIA ANDREA ANGIOLINI

**Orientadora: Profa. Dra. Ursula Matte**

**Co-Orientadora: Dra. Carolina Uribe Cruz**

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

Porto Alegre, Brasil

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

ANGIOLINI, VIRGINIA ANDREA  
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM  
CÉLULAS-TIPO HEPATÓCITOS / VIRGINIA ANDREA ANGIOLINI. -  
- 2017.  
81 f.

Orientador: URSULA MATTE.  
Coorientador: CAROLINA URIBE CRUZ.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,  
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. células-tronco mesenquimais derivadas da  
medula óssea. 2. diferenciação celular. 3. célula-tipo  
hepatócito. 4. vesículas extracelulares. 5.  
insuficiência hepática aguda. I. MATTE, URSULA,  
orient. II. URIBE CRUZ, CAROLINA, coorient. III.  
Título.

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

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

10 / 03 / 2017

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA  
COMPOSTA POR:

Prof<sup>a</sup> Dra. Sandra Maria Gonçalves Vieira

(Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente  
– PPGSCA – UFRGS)

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Helena Da Rosa Paz

(Programa de Pós Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia – PPGCGH – UFRGS)

Prof<sup>a</sup> Dra. Gisele Branchini

(Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal  
de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha Orientadora Profa. Dra. Ursula Matte pelos ensinamentos, pelo tempo dedicado e por ter-me conduzido na persecução das metas incentivando a ir em frente à busca dos resultados.

Agradeço a minha Co-orientadora, Dra. Carolina Uribe quem esteve do meu lado sempre para me auxiliar em cada dúvida. Sempre trabalhando do meu lado e me transmitindo toda sua experiência.

Ao grupo de Centro de Terapia Gênica, e em especial ao grupo de fígado (Graziella, Laura e Mónica) por se mostrarem sempre dispostos a ajudar e acompanhar cada momento da pesquisa.

A minha família, que embora fisicamente longe, sempre me apoiou de perto e me deu a motivação necessária para atingir essa titulação.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental (CPE), da Unidade de Análise de Proteína (UAMP), Patologia Experimental e Unidade de Experimentação animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), por sempre se mostrarem a fim de dar o auxílio solicitado.

Ao Diego pela companhia diária, os momentos de descontração e o apoio incondicional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente por contribuir na minha formação.

Às fontes que financiaram este trabalho (o Fundo de Incentivo a Pesquisa do HCPA) e em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa recebida.

## RESUMO

**Introdução:** O fígado é um órgão chave na manutenção da homeostasia corpórea e o transplante hepático ainda continua sendo o padrão-ouro no tratamento da insuficiência hepática aguda. A falta de doadores tem favorecido o desenvolvimento da terapia celular. Células derivadas de medula óssea podem se diferenciar em células tipo-hepatócitos em menos de 24 horas e a comunicação através de vesículas extracelulares (VEs) é um dos mecanismos propostos para explicar essa capacidade. Muitos estudos têm demonstrado que as células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula tem alta plasticidade para se diferenciar em hepatócitos, mas os protocolos normalmente utilizados levam entre 7 e 28 dias. **Objetivo:** Analisar a capacidade de diferenciação das CTMs da medula em se tornar uma célula tipo-hepatócito através do mecanismo de comunicação celular por VEs em cultura (6 e 24 horas). **Materiais e métodos:** Para avaliar o efeito de hepatócitos primários isolados de ratos saudáveis e lesados com CCl<sub>4</sub> na diferenciação das CTMs foi utilizado um sistema de co-cultivo com insertos que não permitem o contato entre as células colocando as CTMs na câmara superior e os hepatócitos na câmara inferior do sistema. Meio condicionado de hepatócitos com lesão foi utilizado para avaliar a capacidade das CTMs de capturar VEs e se diferenciar em célula-tipo hepatócito. Os marcadores de célula tipo-hepatócito avaliados foram expressão gênica (alfa fetoproteína, albumina e citoqueratina-18), armazenamento de glicogênio e liberação de ureia. Para rastrear VEs, hepatócitos de ratos lesados foram marcados com PKH-26. As VEs foram obtidas por ultracentrifugação do sobrenadante e analisadas por citometria de fluxo. Hepatócitos e CTMs também foram analisados por citometria de fluxo na busca de marcação positiva. **Resultados:** CTMs co-cultivadas durante 6 e 24 horas com hepatócitos não apresentaram expressão de genes hepáticos,

mesmo quando expostas a um ambiente de lesão. Os ensaios funcionais confirmaram a falta de sinais de diferenciação, sendo que não foi observado armazenamento de glicogênio nem liberação de ureia nas CTMs. Um achado interessante foi que ao analisar o sobrenadante da câmara superior do sistema de co-cultivo, não foram achadas VEs marcadas com PKH-26 nem CTMs com rastros do marcador. Por outro lado, os experimentos utilizando meio condicionado mostraram que as CTMs têm capacidade de capturar VEs. A citometria de fluxo mostrou que às 6 horas e 24 horas respectivamente 2,28% e 3,97% das CTMs eram positivas para o marcador PKH-26. Quando analisadas no microscópio de fluorescência, foram vistos pontos vermelhos nas CTMs alguns dos quais parecem carregar a proteína albumina. Porém a expressão gênica e análise de ureia não se adequaram a um perfil de célula tipo-hepatócito. **Conclusões:** O sistema de co-cultivo não foi adequado para permitir a transferência e comunicação através de VEs entre hepatócitos e CTMs sendo que as VEs não conseguem atingir a câmara superior. Os experimentos com meio condicionado sugerem que as CTMs têm capacidade de capturar VEs derivadas de hepatócitos, porém a captação não conduz ao desenvolvimento de um perfil de célula tipo-hepatócito em 6 e 24 horas. São necessários mais estudos para esclarecer a dinâmica de transferência das VEs e suas consequências em longo prazo.

**Palavras chaves:** células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea; diferenciação celular; célula-tipo hepatócito; vesículas extracelulares; insuficiência hepática aguda.

## ABSTRACT

**Introduction:** Liver is a key organ for corporeal homeostasis maintenance and whole organ replacement still remains the gold standard procedure to treat acute liver failure. Shortage of liver donor has promoted the increase on cell-therapy research. Bone marrow (BM) derived cell have shown potential for differentiation into hepatocyte-like cells in a short time and extracellular vesicles communication (EVs) is one of the proposed mechanisms. Plasticity of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) is extensively supported by scientific literature but protocols applied to differentiation usually take from 7 to 28 days. **Objective:** To analyze *in vitro* differentiation potential of BM-MSCs into hepatocyte-like cells through EVs transfer mechanism in 6 and 24 hours. **Materials and Methods:** Co-culture system with cell-impermeable inserts and conditioned medium experiments were used to explore the effects of healthy and CCl<sub>4</sub>-injured hepatocytes, over BM-MSCs differentiation. Assessment of hepatocyte-like cell profile on BM-MSCs was revealed by gene expression (alpha fetoprotein, albumin and cytokeratin-18), glycogen storage and urea release. Hepatocytes from CCl<sub>4</sub>-injured rats were labeled by PKH-26 to track EVs. Ultracentrifugation was used to isolate EVs from supernatant medium of the two chamber of the co-culture system. PKH-26 positive EVs and PKH-26 positive cells were revealed by flow cytometry analysis and fluorescent microscopy. BM-MSCs cultured with conditioned medium were stained with ALB-FITC antibody. **Results:** Co-cultured BM-MSCs for 6 and 24 hours, showed no expression of hepatocyte-like genes, even after exposure to damaged microenvironment. Functional assays confirm the lack of differentiation signs there were no glycogen storage or urea release. Interestingly, EVs traffic analysis revealed no PKH-26 positive EVs at the upper chamber of co-culture system and no positive BM-MSCs were found



either. On the other hand, conditioned medium experiment showed that BM-MSCs could uptake EVs. Flow cytometry analysis showed positive PKH-26 BM-MSCs at 6 (2.28%) and 24 (3.97%) hours. Fluorescence microscopy revealed red points into BM-MSCs and immunofluorescence suggest that some EVs contain albumin. Gene expression and urea assay of BM-MSCs were not in accordance with a hepatocyte-like profile. **Conclusions:** Co-culture system, by using cell-impermeable membrane, was not adequate to promote EVs transfer between hepatocyte and BM-MSCs since EVs do not pass from the lower to the upper chamber. Conditioned medium experiments can suggest that BM-MSCs could uptake hepatocyte-derived EVs but this not drive to a hepatocyte-like profile in a short period of time. More studies will be necessary to clarify the dynamic of EVs transfer and their long time effects.

**Keywords:** Bone marrow mesenchymal stem cell; cell differentiation; hepatocyte-like cell; extracellular vesicles; acute liver failure.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Esquema do lóbulo hepático .....	19
Figura 2 Classificação dos modelos de lesão hepática e principais exemplos .....	22
Figura 3 Hierarquia das células-tronco.....	25
Figura 4 Possíveis mecanismos de diferenciação de CTM em células tipo-hepatócitos.	31
Figura 5 Imunofenotipagem de células aderentes analisadas durante 3 passagens .....	33
Figura 6 Esquema mostrando a disposição das células no co-cultivo.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detalhe das sequências de <i>primers</i> utilizadas, temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon. ....	41
---	----

## LISTA DE ABREVIACOES

Afp	Alfa-fetoproteina
Alb	Albumina
ALT:	Alanina Aminotransferase
AST:	Aspartato Aminotransferase
b-Act	Beta Actina
CD:	<i>Cluster of Differentaition</i>
cDNA:	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CCl <sub>3</sub> *:	Radical Triclorometil
CCl <sub>4</sub> :	Tetracloreto de Carbono
CCl <sub>3</sub> OO*:	Peróxido de Triclorometil
Ck-18	Citoqueratina18
CTA:	Célula Tronco Adulta
CTH:	Célula Tronco Hematopoiética
CTMs:	Células Tronco Mesenquimais
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico

FMMO:	Fração Mononuclear da Medula Óssea
FAd:	Fração Aderente
FNAd:	Fração Não Aderente
HLA:	Antígeno Leucocitário Humano
IHA:	Insuficiência Hepática Aguda
miRNA:	Micro <i>RNA</i>
P/E:	Penicilina/Estreptomicina
RNA:	Ácido Ribonucleico
RPM:	Rotações por minuto
RT-PCR:	Transcrição Reversa seguido de Reação em cadeia da Polimerase
SFB:	Soro Fetal Bovino
VEs	Vesículas Extracelulares

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Anatomia e fisiologia do fígado.....	18
2.2	Caracterização da doença hepática aguda.....	20
2.3	Modelos animais .....	21
2.3.1	Modelo de Tetracloreto de Carbono.....	21
2.4	O uso da terapia celular no tratamento da IHA .....	23
2.5	Mecanismos de Diferenciação Celular .....	30
3	JUSTIFICATIVA.....	32
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	Objetivo Geral.....	34
4.2	Objetivos Específicos .....	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
5.1	Animais, aspectos éticos e tamanho amostral.....	35
5.2	Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais.....	35
5.3	Imunofenotipagem e diferenciação multilinhagem .....	36
5.4	Indução de lesão hepática aguda.....	37
5.5	Caracterização do modelo de lesão.....	37
5.6	Isolamento de hepatócitos.....	38

5.7	Coloração da membrana dos hepatócitos.....	38
5.8	Modelo de co-cultivo e tempos de análise.....	39
5.9	Experimentos com meio condicionado.....	40
5.10	Análise de expressão gênica das células.....	40
5.11	Análise de secreção de Ureia.....	41
5.12	Extração de vesículas extracelulares.....	41
5.13	Análise de marcação das vesículas extracelulares.....	42
5.14	Análise estatística.....	42
6	REFERÊNCIAS.....	43
7	ARTIGO.....	50
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão chave na manutenção da fisiologia do corpo sendo o principal responsável pelo processamento e conversão de substâncias tóxicas e um participante ativo na produção de proteínas sanguíneas (ABDEL-MISIH; BLOOMSTRON, 2014; MICHALOPOULOS, 2007; PATEL; TASKAR; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2016). A insuficiência hepática aguda (IHA) é uma condição que deteriora rapidamente a saúde do paciente e não havendo recuperação espontânea, o tratamento definitivo ainda continua sendo o transplante hepático (BAEKDAL M; YTTING H; LARSEN FS, 2016; BERNAL; WENDON, 2013; LEE, W. M.; STRAVITZ; LARSON, 2012). O reconhecido problema da falta de disponibilidade de órgãos para o transplante tem levado à investigação de possíveis alternativas terapêuticas através do uso da terapia celular.

A medula óssea tem sido estudada nas últimas décadas e tem se mostrado promissora no tratamento da IHA, revertendo a condição da doença em estudos *in-vivo* (URIBE-CRUZ *et al.*, 2016). Diferentes frações sub-celulares podem ser encontradas na medula óssea, dentre elas linfócitos, monócitos, células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais (CTMs) (BALDO *et al.*, 2010). Ao longo dos anos, o potencial de diferenciação em células-tipo hepatócitos para algumas das subpopulações da medula tem sido avaliado e estudos *in-vitro* demonstram que marcadores de diferenciação podem ser vistos em tempos bem precoces e que o ambiente de dano favorece o processo de diferenciação (JANG *et al.*, 2004; SIMON *et al.*, 2015; URIBE CRUZ *et al.*, 2014; URIBE-CRUZ *et al.*, 2016). No entanto, qual o melhor tipo celular, tempo e condição de diferenciação, além dos mecanismos que regulam o processo, são questões que ainda não foram resolvidas.



Protocolos específicos de diferenciação têm sido estabelecidos utilizando CTMs. Estes protocolos têm sido bem sucedidos em atingir um fenótipo de célula-tipo hepatócito, mas a maioria deles utiliza o acréscimo de fatores de crescimento e citocinas como promotores de diferenciação (AURICH, I. *et al.*, 2007; BANAS *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2005; TAKUMI *et al.*, 2005; YINGJIE WANG, 2014; ZHANG, Y.-N.; LIE; WEI, X., 2009). O uso desses fatores apresenta problemas para posterior aplicação nos pacientes, dado o potencial carcinogênico que apresentam (LI *et al.*, 2010). Embora em número menor, estudos sem adição de hormônios também se mostraram promissores no que se refere à diferenciação, porém, os tempos de cultura necessários para atingir o fenótipo hepático mostrou-se sempre, superior aos 7 dias.

Um trabalho prévio do grupo teve como objetivo analisar o potencial de diferenciação da fração aderente (que representa as CTMs) e não aderente (células tronco hematopoiéticas) da medula óssea quando em co-cultivo com hepatócitos saudáveis e lesados, em tempos precoces: 2, 6 e 24 horas (SIMON, 2013). Os resultados mostraram que após 24 horas a fração não aderente apresentava um fenótipo de célula tipo-hepatócito, porém esses sinais de diferenciação não foram achados na fração aderente. Uma limitação do estudo foi o uso de CTMs na passagem zero, constituindo portanto uma população heterogênea, na qual se encontravam outros tipos celulares. Para que os dados em relação às CTMs fossem confiáveis, era necessário utilizar uma população homogênea, portanto em passagem mais alta.

O objetivo da presente dissertação foi aprofundar o estudo da capacidade de diferenciação das CTMs em um ambiente de co-cultivo com hepatócitos saudáveis e lesados, utilizando uma população de CTMs totalmente homogênea.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

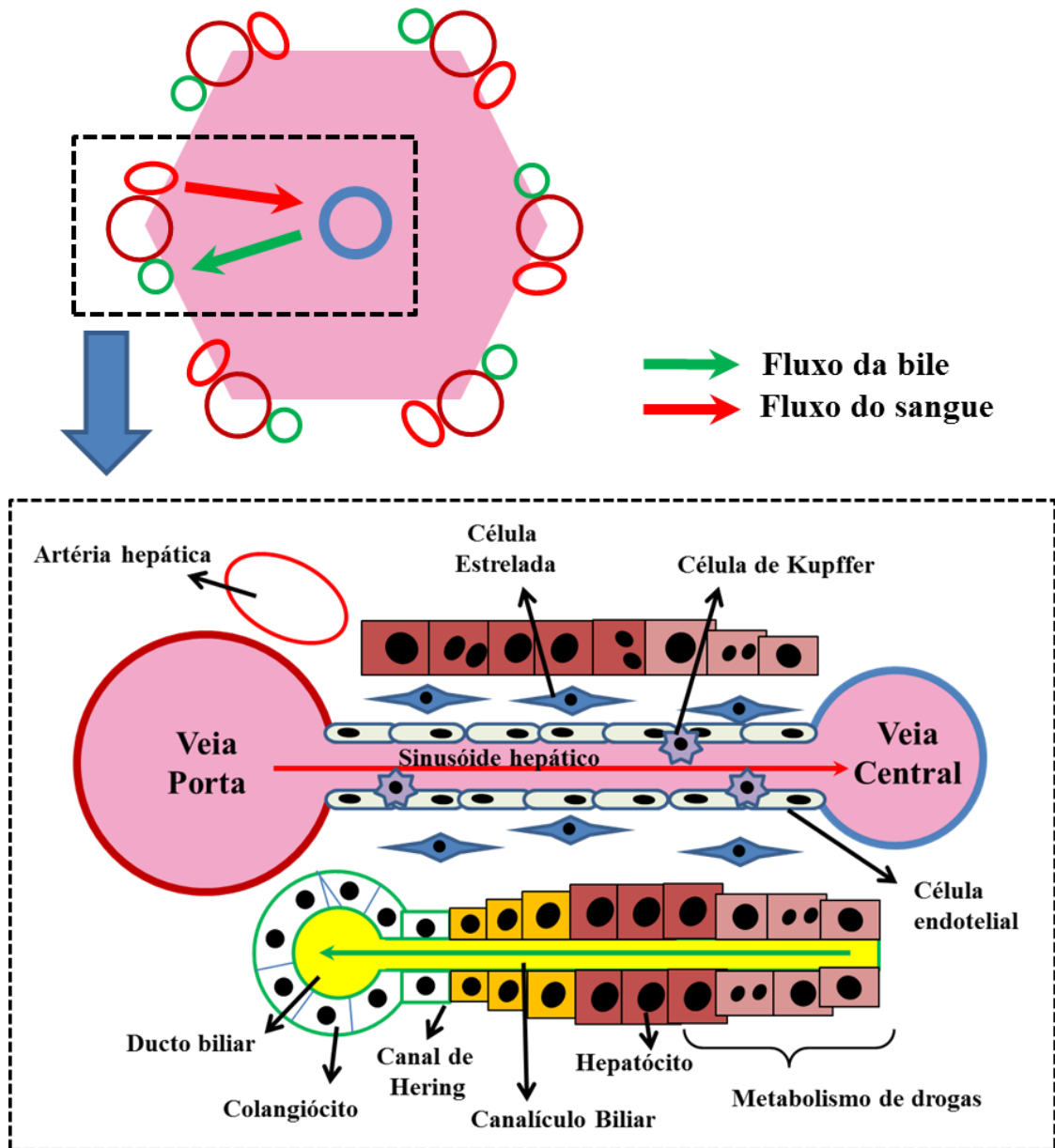
### **2.1 Anatomia e fisiologia do fígado**

O fígado é a maior glândula do corpo e apresenta importante quantidade de vasos sanguíneos, recebendo 25% do total do gasto cardíaco. Aproximadamente 75% do sangue que circula pelo fígado, entra pela veia porta, a qual diminui em calibre até chegar no sinusóide hepático (Figura 1). Essa vascularização, junto a um conjunto enzimático e outras características anatômicas especializadas permitem ao fígado desempenhar, dentre outras, a importante função de desintoxicação, através da metabolização de drogas, eliminando até 70% das substâncias tóxicas do indivíduo (ABDEL-MISIH; BLOOMSTRON, 2014; PATEL; TASKAR; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2016).

Os nutrientes que chegam ao fígado são transformados em proteínas secretadas, sendo exemplos albumina, fatores de coagulação e carreadores de proteínas plasmáticas, lipídeos liberados no sistema em forma de complexos lipoproteicos e hidratos de carbono, que são armazenados como grânulos de glicogênio constituindo a fonte mais importante de glicose. Trata-se então de um órgão chave no controle e manutenção da homeostasia corporal (MICHALOPOULOS, 2007).

A maioria destas funções é desempenhada pelos hepatócitos, a célula parenquimatosa do fígado, que constitui 80% da sua massa total. Os hepatócitos são células epiteliais altamente polarizadas que formam cordões e em associação com a artéria hepática, veia porta, ducto biliar (6 tríades no total) e uma veia centrolobular (ou vênula terminal) constituem a subunidade funcional do fígado: o lóbulo hepático (Figura 1). Os 20% restantes correspondem às células não parenquimatosas, que

incluem os macrófagos residentes do fígado (células de Kupffer), linfócitos e células estreladas produtoras da matriz extracelular, quando ativadas ou fora do estado quiescente (TANAKA; MIYAJIMA, 2016).



**Figura 1** Esquema do lóbulo hepático. O sangue flui no fígado desde a veia porta e a artéria hepática através do sinóide hepático até chegar na veia centro-lobular. A bile produzida pelos hepatócitos é coletada no canalículo biliar até chegar ao ducto biliar. No espaço luminal do sinóide podem se encontrar os macrófagos que residem no fígado (células de Kupffer) e por fora do sinóide, mas bem próximo dele estão as células estreladas, produtoras da matriz extracelular, quando ativadas. O Canal de Hering corresponde à junção dos hepatócitos e o ducto biliar (Adaptado de TANAKA; MIYAJIMA, 2016).

## 2.2 Caracterização da doença hepática aguda

A Insuficiência hepática aguda (IHA) é uma síndrome caracterizada pela ocorrência de falências na função hepática em pacientes previamente saudáveis, sem antecedentes de doença hepática crônica e que conduzem à encefalopatia hepática, icterícia, coagulopatia, culminando com falha generalizada dos órgãos podendo levar à morte (PANACKEL *et al.*, 2015). As principais causas da IHA são a toxicidade hepática em resposta a drogas e as hepatites virais agudas (Hepatite A, B e E) (BAEKDAL; YTTING; LARSEN, 2016; BERNAL; WENDON, 2013). Uma década atrás no sul do Brasil, o principal fator causante do desenvolvimento da IHA em crianças, a hepatite viral A (FERREIRA *et al.*, 2008). Atualmente, a maioria dos casos de IHA das crianças do sul do Brasil, é indeterminada. Embora décadas atrás tenham sido realizados importantes avanços no manejo clínico dos pacientes, principalmente no setor dos cuidados intensivos e na resolução mais rápida do diagnóstico da síndrome, o único tratamento eficiente ainda continua sendo o transplante hepático (LEE *et al.*, 2012). Os pacientes que recebem transplante tem alto grau de sobrevida (80-90%), porém em decorrência da falta de órgãos disponíveis, entre 25 e 40% morrem em lista de espera (POLSON; LEE, 2005). Além disto, os pacientes transplantados estão propensos a riscos de rejeição e a necessidade de imunossupressão (WU; TAO, 2012).

O informe anual de 2015 realizado pelo Registro Brasileiro de Transplante (Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2015/anual-n-associado.pdf>) mostra que nos últimos dez anos tem se duplicado a quantidade de transplantes hepáticos realizados, passando de 949 em 2005 a 1809 em 2015. O Rio Grande do Sul foi o estado que mais realizou esse tipo de transplante por número de habitantes. Em relação aos transplantes pediátricos, 72% das crianças ingressadas em

lista de espera foram transplantadas, mas em dezembro de 2015 o registro aponta que 102 crianças ainda estavam no aguardo de transplante hepático mostrando que é uma necessidade acrescentar o número de órgãos disponíveis para atender todos os pacientes que ingressam na lista.

### **2.3 Modelos animais**



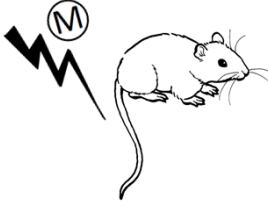
O uso de modelos animais para doenças específicas permite aos investigadores entenderem a fisiologia de uma determinada doença assim como analisar possíveis tratamentos que a resolvam (VOSOUGH *et al.*, 2011). Para um modelo ser eficiente, é necessário apresentar: (1) Reversibilidade, o animal pode sobreviver; (2) Reprodutibilidade, garantindo repetição e padronização dos resultados; (3) Morte devido à falência hepática, refletindo o padrão clínico; (4) Janela terapêutica, tempo durante o qual é possível administrar um tratamento e avaliar os efeitos; (5) Abrangente, sendo efetivo em diferentes animais e (6) Mínimos riscos sobre o pesquisador que aplica a técnica (TERBLANCHE; HICKMAN, 1991).

De maneira geral, os modelos de lesão hepática que existem são classificados em três grupos: indução do dano por toxinas/fármacos, modelos cirúrgicos e modelos de doenças hepáticas hereditárias. Alguns exemplos de cada grupo são apresentados na figura 2. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, mas nenhum mimetiza exatamente as condições fisiopatológicas humanas (VOSOUGH *et al.*, 2011).

#### **2.3.1 Modelo de Tetracloreto de Carbono**

O tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) é uma substância orgânica empregada na indústria como solvente, mas altamente tóxica. Quando no fígado, esta molécula CCl<sub>4</sub> sofre uma série de modificações químicas que conduzem à lesão (ÖZERKAN; ÖZSOY;

YILMAZ, 2015). De maneira simplificada, o complexo enzimático do citocromo P450 gera a formação de um primeiro radical livre, chamado de radical triclorometil ( $\text{CCl}_3^*$ ),

MODELO	EXEMPLOS
<p>Induzido por toxinas</p> 	<p>Paracetamol  <math>\text{CCl}_4</math>            Etanol            D-galactosamina.</p>
<p>Cirúrgico</p> 	<p>Hepatectomia total            Hepatectomia parcial            Ligação de artéria hepática            Ligação de veia porta            Ligação de ductos biliares</p>
<p>Hereditário</p> 	<p>Hidrolase fumarilacetoacetato (FAH)            Activador do plasminogénio tipo urocinase(uPA)</p>

**Figura 2** Classificação dos modelos de lesão hepática e principais exemplos (Adaptado de VOSOUGH *et al.*, 2011).

capaz de reagir com compostos estruturais da célula. Quando em um ambiente aeróbico, este radical produz um composto ainda mais reativo, chamado de peróxido de triclorometil ( $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ ) capaz de iniciar a peroxidação lipídica da membrana celular, uma cadeia de eventos que culminam na desintegração e perda da funcionalidade da membrana, além de poder causar modificações nos níveis de fatores e receptores relacionados à apoptose celular e reparo do DNA (MANIBUSAN; ODIN; EASTMOND, 2007; TASDUQ *et al.*, 2008).

O uso de CCl<sub>4</sub> tornou-se um modelo químico de lesão hepática, tanto crônico (quando administrado em baixas doses e várias aplicações) (GOLDANI *et al.*, 2007) quanto agudo (quando administrado em uma única dose tóxica). A dose aguda de 1,25 mL/kg administrada via gavagem em ratos foi estabelecida previamente pelo nosso grupo de pesquisa e tem se mostrado efetiva em induzir IHA, apresentando uma extensão de lesão máxima 24hs após administração do CCl<sub>4</sub> (BALDO *et al.*, 2010). A lesão pode ser confirmada macroscopicamente (fígado com aparência de noz moscada), microscopicamente através de áreas de necrose perto das veias centrolobulares e esteatose e também na sorologia, estando descrito um aumento de três vezes nos níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (BALDO *et al.*, 2010).

#### **2.4 O uso da terapia celular no tratamento da IHA**

Nas últimas décadas, tem crescido cada vez mais os estudos avaliando o potencial da terapia celular como tratamento para a IHA. As células transplantadas poderiam restabelecer as funções do fígado e permitir a sua regeneração ou servir como uma ponte para o transplante, proporcionando estabilidade clínica até que o procedimento se torne efetivo (VOSOUGH *et al.*, 2011). Além de ser uma oportunidade terapêutica para aqueles pacientes aguardando o transplante, a terapia celular tem a vantagem de ser uma técnica menos invasiva, de menor custo, relativamente simples, repetível e dependendo do tipo celular escolhido poderiam existir outros benefícios associados, como a não necessidade do uso de imunossupressores em longo prazo (SUN *et al.*, 2014).

Dentre os tipos celulares candidatos para terapia celular, os estudos laboratoriais e clínicos mostram que as fontes potenciais para o tratamento da IHA seriam os

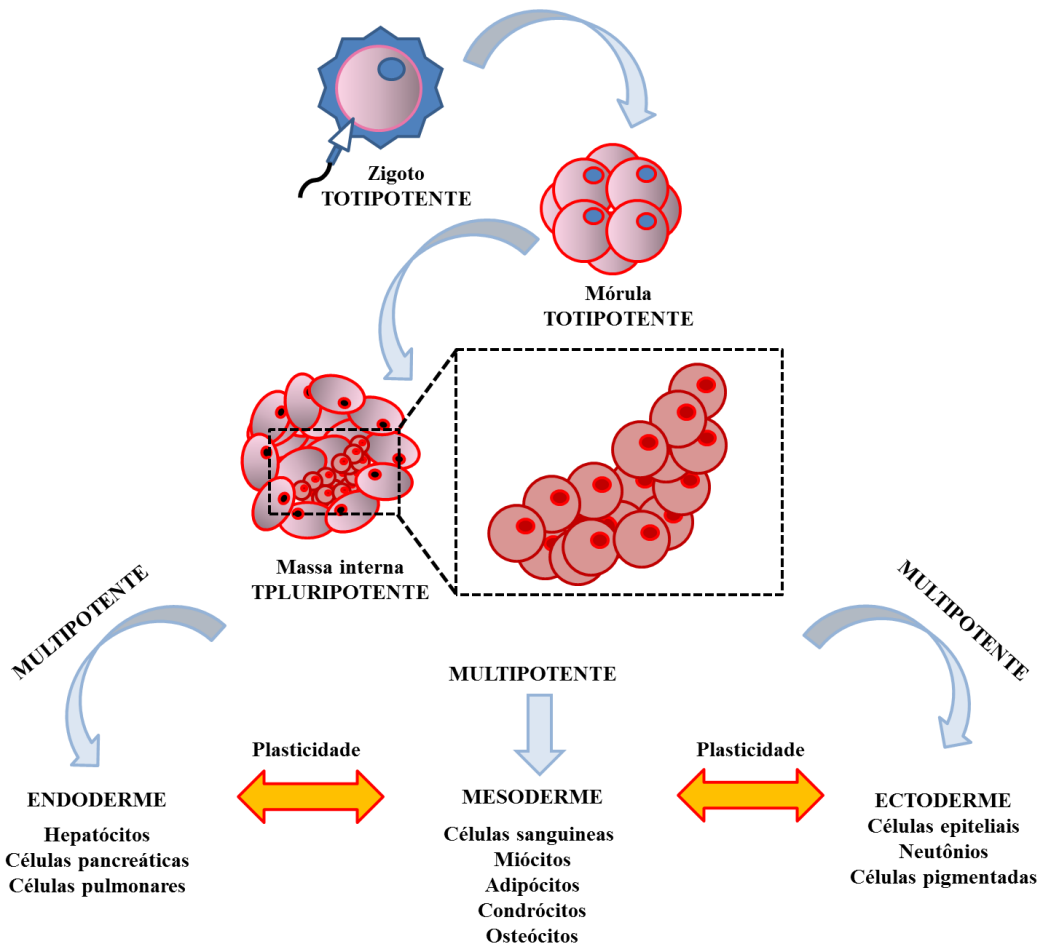
próprios hepatócitos adultos, as células tronco embrionárias ou as células tronco adultas (CTA) (SUN *et al.*, 2014).

Uma célula-tronco é definida pela capacidade de se dividir assimetricamente dando origem tanto a uma célula-tronco idêntica quanto a outra diferenciada (SANTORO *et al.*, 2016). Existem diferentes células tronco que são classificadas em função da sua capacidade de diferenciação e origem. As células que podem dar origem a qualquer tipo celular (tecido embrionário ou extra-embrionário) são chamadas de totipotentes e correspondem ao zigoto fecundado e suas primeiras divisões. Seguem as células pluripotentes, capazes de originar qualquer célula embrionária das três camadas germinativas e que correspondem à massa interna do blastocisto. Já com uma versatilidade restrita a apenas algumas linhagens, estão as células multipotentes, que podem ser achadas em diferentes fases do desenvolvimento, em diferentes tecidos e inclusive no indivíduo adulto (SALEM; THIEMERMANN, 2010; SURANI; TISCHLER, 2012) (Figura 3). Mais recentemente um novo grupo, chamado de células tronco induzidas, foi desenvolvido a partir da desdiferenciação de células adultas mediante a expressão de um grupo de fatores de transcrição que fazem a célula readquirir as mesmas propriedades de uma célula tronco embrionária pluripotente (TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, 2006).

A obtenção de hepatócitos adultos tem as mesmas limitações que o transplante hepático (VOSOUGH *et al.*, 2011), além da perda da funcionalidade por criopreservação e a dificuldade de manutenção em cultura por causa da rápida desdiferenciação (MURACA, 2011; SHIOTA; ITABA, 2016) Por outro lado, questões éticas restringem o uso de células embrionárias, além do seu conhecido potencial



oncogênico (BLUM; BENVENISTY, 2008; DALEY *et al.*, 2016). Portanto, a atenção principal das aplicações terapêuticas têm se focado no uso de CTA.



**Figura 3** Hierarquia das células-tronco. O zigoto fecundado até o estágio de mórula é capaz de produzir todos os derivados embrionários e extraembrionários, sendo suas células ditas totipotentes. A massa interna do blastômero só gera células embrionárias, sendo pluripotentes. Por último existem as células multipotentes com capacidade de diferenciação limitada a apenas algumas linhagens. Quando células cruzam as barreiras germinativas, acontece o fenômeno chamado de plasticidade (Baseado em SALEM; THIEMERMANN, 2010).

As CTA correspondem a células multipotentes somáticas, com capacidade de diferenciação restrita preferencialmente às linhagens da camada em que foram originadas. Estão presentes nos tecidos adultos e tem como principal papel fisiológico a manutenção da integridade do órgão ou tecido alvo, bem como a atuação específica no reparo em caso de dano tecidual (EHNINGER; TRUMPP, 2011; GOMILLION; BURG, 2006).

Estudos tem sugerido que as CTA não necessariamente limitam sua capacidade de diferenciação a células do tecido de origem, pelo contrário, as evidências indicam que podem ir além das barreiras impostas pela camada germinativa da qual derivam e manifestar características de plasticidade (Figura 3). Este é um conceito revolucionário na biologia, que vai por sobre o dogma que limita o potencial de diferenciação, assegurando que uma vez ultrapassada a determinação correspondente às camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme), a célula-tronco seria incapaz de voltar e se tornar uma célula de outra camada (MURACA, 2011; SNYKERS *et al.*, 2006)

As CTA foram isoladas de uma variedade de órgão e tecidos, como o fígado, cérebro, rim, pulmão, coração apresentando-se como promissoras no tratamento de inúmeras doenças que afetam cada um destes sítios, tendo sido observados avanços em estudos *in vitro* e *in vivo* (SALEM; THIEMERMANN, 2010; TURKSEN, 2013).

A medula óssea é considerada como a fonte melhor caracterizada de CTA (BALDO *et al.*, 2010; BELARDINELLI *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2014; SALEM; THIEMERMANN, 2010; SIMON *et al.*, 2015; URIBE-CRUZ *et al.*, 2016). A medula contém populações celulares heterogêneas, sendo a fração mononuclear (FMMO) composta principalmente por linfócitos ( $78,5 \pm 4,2\%$ ) e monócitos ( $10,4 \pm 0,6\%$ ), uma porção menor de células precursoras endoteliais ( $1,39 \pm 0,87\%$ ), e outra ainda menor de CTMs e Células Tronco Hematopoiéticas (CTH), respectivamente  $0,48 \pm 0,09\%$  e  $0,48 \pm 0,37\%$  (BALDO *et al.*, 2010).

#### 2.4.1.1 Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

As CTMs são definidas como células não hematopoiéticas, derivadas da mesoderme e presentes em diferentes órgãos e tecidos conjuntivos (NADERI *et al.*, 2016). Primeiramente foram descritas por Friedenstein e colaboradores em 1968 como

células semelhantes a fibroblastos, capazes de se aderir ao plástico e que podiam ser isoladas da medula óssea. Posteriormente, foram obtidas de outras fontes, como cordão umbilical, tecido adiposo, tecido placentário, fígado, baço, sangue menstrual, líquido amniótico e pâncreas (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011).

Principalmente por causa da variedade de tecidos em que são obtidas e pelas metodologias de extração e condições de cultura, as CTMs manifestam capacidades proliferativas e plasticidade diferentes dificultando a comparação entre os distintos grupos de trabalho. Para resolver estas limitações foi estabelecida uma série de critérios para caracterizar as CTMs humanas: (1) morfologia fibroblastóide e capacidade de adesão ao plástico em condições de cultura padrão; (2) marcadores positivos de membrana (CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>) e negativos (CD14<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, HLA II<sup>-</sup>); (3) diferenciação em linhagens de tecido conjuntivo como adipócitos, condrócitos e osteócitos quando subministradas as condições adequadas *in vitro*, (DAHLKE *et al.*, 2004; DOMINICI *et al.*, 2006; SECUNDA *et al.*, 2015). Estes mesmos critérios são utilizados na caracterização das CTMs animais, não sendo necessários na caracterização todos os marcadores de membrana exigidos em CTMs humanas.

Estudos demonstraram a plasticidade das CTMs, atravessando as barreiras e se diferenciando não só em células da camada mesodérmica, mas também dando origem a células epiteliais (LANGE *et al.*, 2005; SNYKERS *et al.*, 2006). Os múltiplos benefícios do uso das CTMs, como fácil isolamento e expansão *in vitro*, possibilidade de autotransplante, ausência de antígeno leucocitário humano classe II e propriedades imunomodulatórias, têm contribuído para o amplo estudo das CTMs como possível fonte de células tipo-hepatócitos.

Nas últimas décadas vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade de diferenciação de CTMs e potencial aplicação no ambiente de lesão hepática tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AURICH, H *et al.*, 2009; AURICH, I. *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; WU, X.-B.; TAO, 2012). Sabe-se que o ambiente de lesão promove a chegada (*homing*) e permanência de células tronco no tecido lesado contribuindo para o restabelecimento da homeostase do fígado através da diferenciação (WU; TAO, 2012).

Entre os estudos que avaliam a diferenciação de CTMs, a grande maioria corresponde a protocolos bem estabelecidos (de um, dois e três passos) *in vitro* administrando fatores de crescimento (principalmente HGF e FGF) e citocinas específicas (como Oncostatina M) sendo necessário entre 3-4 semanas para diferenciação em hepatócitos (AURICH, I. *et al.*, 2007; BANAS *et al.*, 2007; SEO *et al.*, 2005; TAKUMI *et al.*, 2005; YINGJIE WANG, 2014; ZHANG, Y.-N.; LIE; WEI, X., 2009). Porém, a crítica principal destes protocolos é que as células resultantes não podem ser aplicadas em pacientes por existir potencial oncogênico; sendo necessário se excluir estas substâncias nos estudos que buscam aplicação clínica (LI *et al.*, 2010). Entretanto, o desenvolvimento destes protocolos é interessante para a indústria farmacêutica na criação de um estoque de células tipo-hepatócitos para serem utilizadas na triagem de medicamentos de interesse (SNYKERS *et al.*, 2006).

Por outro lado, foram estabelecidos protocolos sem o acréscimo de fatores de crescimento e que se baseiam na ação direta ou indireta dos hepatócitos como indutores da diferenciação. Como exemplo de diferenciação por contato direto LANGE *et al.*, 2005 demonstram que CTMs extraídas de rato expressam albumina (*Alb*) e citoqueratina-18 (*Ck-18*) duas semanas após serem co-cultivadas com hepatócitos

(LANGE *et al.*, 2005). Outra modalidade é o cultivo indireto, usando membranas semipermeáveis que separam os tipos celulares limitando o processo de diferenciação aos fatores parácrinos que permitem a comunicação celular. LI *et al.*, 2008 mostraram que CTMs em co-cultivo indireto com hepatócitos saudáveis isolados de rato apresentavam forma arredondada e fenótipo de célula hepática progenitora após 14 dias expressando *Alb*, alfa-fetoproteína (*Afp*) e *Ck-19* mas não *Ck-18*. Quando implantadas em ratos com doença crônica causada por  $\text{CCl}_4$  os autores descrevem que essas células continuam como células progenitoras até a 3<sup>ra</sup> semana mas se diferenciam *in vivo* em hepatócitos uma semana após (LI *et al.*, 2010). Seguindo a mesma lógica, outra modalidade de cultivo indireto é o uso de meio condicionado de hepatócitos. BORHANI-HAGHIGHI *et al.*, 2015 por exemplo, trataram CTMs de cordão umbilical humano permeabilizadas com extrato de hepatócitos de linhagem HepG2 durante 17 dias e observaram expressão proteica de ALB, CK18, CK19 e funcionalidade através do acúmulo de glicogênio e captação de indocianina (BORHANI-HAGHIGHI *et al.*, 2015; SARVANDI *et al.*, 2015). Outro estudo também conseguiu resultados similares em 16-21 dias sem permeabilizar previamente as CTMs (SARVANDI *et al.*, 2015)

Como visto nos parágrafos anteriores, os estudos realizados até então com CTMs mostram sinais que indicam capacidade de diferenciação. Porém os tempos de cultivo necessário para atingir o fenótipo tipo-hepatócito parecem ser longos. Em geral, os tempos de análises se distribuem entre os 7 e 28 dias e o aparecimento das características de células tipo-hepatócitos adulto vai aumentando com o decorrer do tempo de cultivo.

Mais recentemente, o cultivo em modelos tridimensionais tem sido aplicado com o intuito de melhorar o processo de diferenciação. Relata-se que a mudança de fenótipo

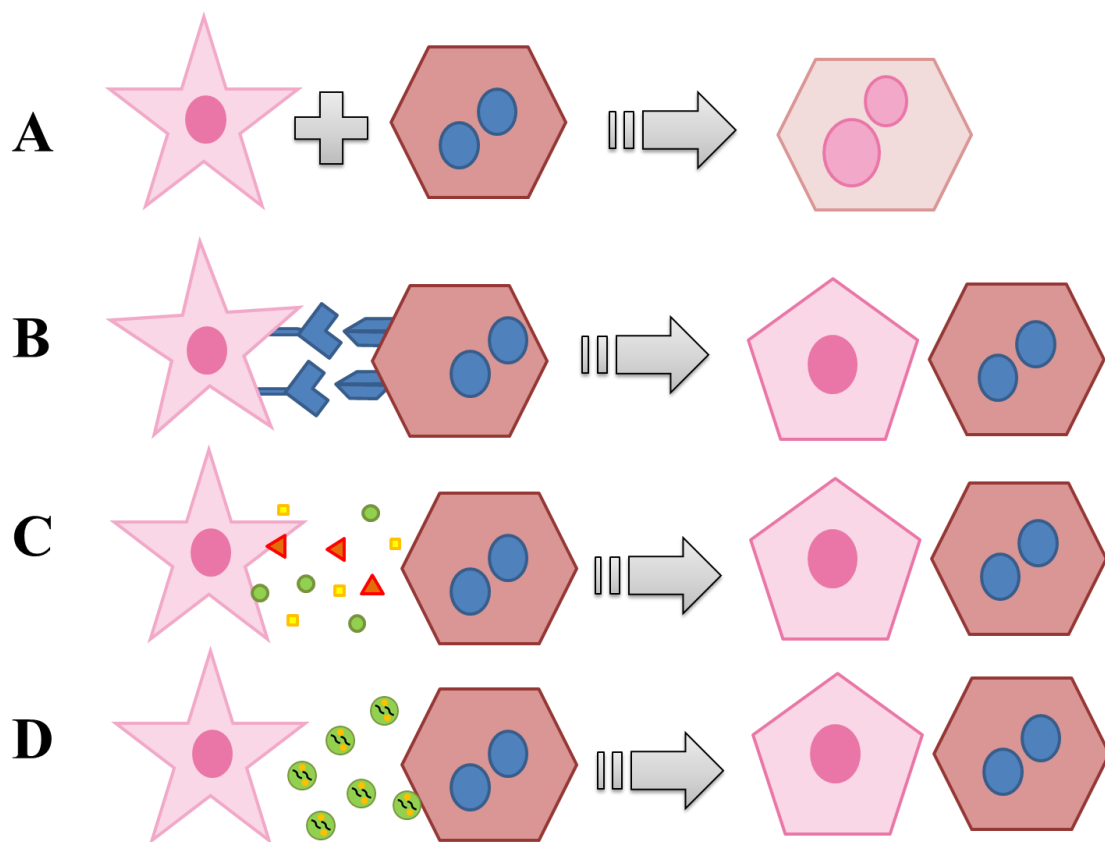
celular atinge um grau maior quando as células são cultivadas em modelos de matriz que permitem o contato intercelular tridimensional, porém os tempos de cultivo ainda continuam sendo igualmente prolongados (BAO *et al.*, 2016).

## 2.5 Mecanismos de Diferenciação Celular

Conhecendo a origem mesodérmica das CTMs foi de grande controvérsia inicialmente a aceitação de que pudessem de fato se diferenciar em células hepáticas. Diferentes mecanismos de diferenciação têm sido propostos. As primeiras argumentações utilizadas para explicar os achados de diferenciação se baseavam na fusão celular; as CTMs, quando em contato com o hepatócito poderiam formar um heterocarion (LANGE *et al.*, 2005; QUINTANA-BUSTAMANTE *et al.*, 2006) (Figura 4A) ou o simples contato direto entre as células induziria a diferenciação celular (JANG *et al.*, 2004) (Figura 4B). Um terceiro mecanismo demonstrado *in vitro* estaria baseado nos fatores parácrinos (fatores de crescimento e citosinas) que medeiam a comunicação intercelular e que atuariam promovendo a diferenciação (BORHANI-HAGHIGHI *et al.*, 2015; SARVANDI *et al.*, 2015) (Figura 4C).

Dentre os mecanismos que medeiam diferenciação à distância, nos últimos anos tem recebido grande importância a comunicação intercelular mediante liberação de VEs (Figura 4D). As VEs são corpos de bicamada lipídica que encerram componentes citoplasmáticos e atuam na transferência de compostos bioativos que podem modificar o fenótipo e as funções da célula receptora (BRUNO; DEREGIBUS; CAMUSSI, 2015). O termo VEs tem sido sugerido para se referir a exossomos e microvesículas, originados a partir da membrana endossomal ou membrana plasmática, respectivamente, dada a dificuldade de separação de um tipo de vesícula do outro, sendo sua diferença baseada meramente no mecanismo de formação (QUESENBERRY *et al.*,

2015). Foi demonstrado que as VEs carregam uma ampla variedade de moléculas, como proteínas, fatores de crescimento, RNAs mensageiros e miRNA reguladores (BRUNO; DEREGIBUS; CAMUSSI, 2015; EIRIN *et al.*, 2014; LAI; YEO; LIM, 2015). Os componentes carregados não seriam aleatórios, mas sim dependentes das condições celulares. Foi demonstrado que hepatócitos lesados com CCl<sub>4</sub> liberam VEs contendo *Alb* e que células não aderentes da medula óssea têm capacidade de capturar essas VEs e se diferenciar em células tipo-hepatócitos (SIMON *et al.*, 2015). Os métodos comumente empregados para detectar a captura das VEs pela célula alvo se baseiam na marcação da membrana da célula que origina as VEs ou das próprias VEs através de corantes fluorescentes lipofílicos, sendo alguns exemplos PKH-67, PKH-26, R18, Dil e DiD (MULCAHY *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Possíveis mecanismos de diferenciação de CTMs em células-tipo hepatócitos. (A) Fusão celular (B) Contato direto de receptores transmembrana (C) Efeitos parácrinos (D) Microvesículas

### 3 JUSTIFICATIVA

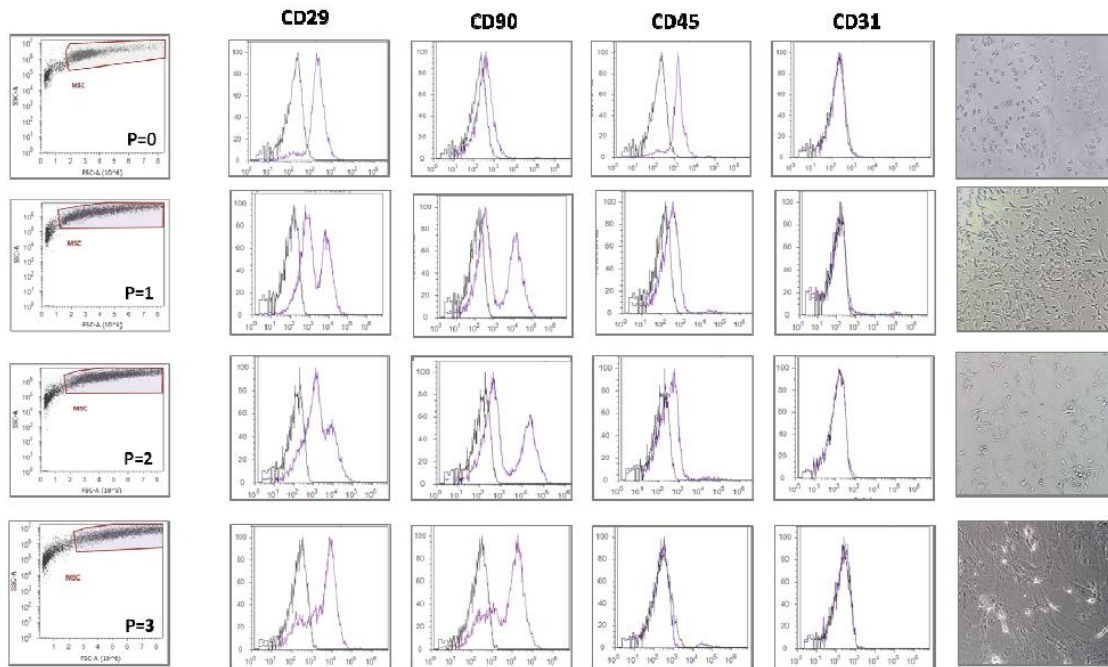
Nosso grupo vem estudando o efeito da terapia celular com células da medula óssea em modelos animais de IHA há quase dez anos. Estudos com isolamento e encapsulação de células da FMMO transplantadas em animais com IHA causada por CCl<sub>4</sub> demonstraram que, 48hs após o transplante, as células da FMMO expressavam características de hepatócitos (URIBE-CRUZ, 2013).

A seguir foi padronizado um modelo *in vitro* de co-cultivo de hepatócitos perfundidos de animais com lesão por CCl<sub>4</sub> e células da FMMO microencapsuladas onde só era permitida a passagem de fatores parácrinos. Os resultados deste trabalho demonstraram que após apenas 6 hs de co-cultivo com hepatócitos lesados, as células da FMMO microencapsuladas começavam a expressar *Albumina (Alb)* (URIBE-CRUZ, 2013).

Com base nesses resultados foi padronizado outro modelo de co-cultivo utilizando insertos com poros de 0,4µm onde foi analisado separadamente o potencial de diferenciação de duas frações celulares da FMMO, uma Fração Não Aderente (FNAd) e outra Fração Aderente (FAd). Estas populações contêm os tipos celulares mais promissores em termos de diferenciação: CTH e CTMs, respectivamente. Foi observado que após 24 hs de co-cultivo com hepatócitos com lesão por CCl<sub>4</sub>, a FNAd manifestava características de células tipo-hepatócitos (expressão gênica e proteica de *Alb* e produção de ureia) e que o mecanismo que explicaria os achados seria a transferência de vesículas extracelulares (VEs) entre as células (SIMON *et al.*, 2015). Porém, foi intrigante não termos achado nenhum sinal de diferenciação na FAd, que contêm as CTMs. Uma das explicações sugeridas para a ausência de diferenciação foi a heterogeneidade da população utilizada (em passagem 0, P=0), a qual ainda apresentava



porcentagens de marcação positiva para CD45 e pouca marcação de CD90 (Figura 5) (SIMON, 2013)



**Figura 5** Imunofenotipagem de células aderentes analisadas durante 3 passagens. Os histogramas mostram incremento na marcação de CD29 e CD90 nas CTMs e diminuição dos marcadores hematopoiéticos CD45. CD31 não foi detectado em nenhum ponto. A coluna esquerda representa o gráfico de pontos com a setagem da população e a direita a morfologia das células ao longo do tempo. (SIMON, 2013)

Este resultado intrigante nos instigou a buscar novas hipóteses que permitam aprofundar o estudo da capacidade de diferenciação precoce das CTMs. Identificar populações capazes de mostrar sinais de diferenciação em um período curto de tempo e conhecer os mecanismos que possibilitam essa diferenciação, permitiria avançar no uso clínico da terapia celular autóloga em condições imediatas suprimindo a dependência de disponibilidade de um órgão compatível. Isso é especialmente importante no caso de uma enfermidade aguda, como a IHA.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Determinar a capacidade das CTMs derivadas da medula óssea de se diferenciar em células tipo-hepatócitos adultos num sistema de co-cultivo com hepatócitos saudáveis ou lesionados por CCl<sub>4</sub>.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar as CTMs através da morfologia, dos marcadores de superfície celular e potencial de plasticidade;

- Avaliar a capacidade de diferenciação das CTMs em células tipo-hepatócitos após co-cultivo com hepatócitos isolados de animais com ou sem lesão por CCl<sub>4</sub> por diferentes tempos, através da expressão de genes hepáticos por RT-PCR;

- Determinar a capacidade das células diferenciadas de realizarem funções típicas de hepatócitos através de ensaios funcionais *in vitro*;

- Analisar potenciais mecanismos promotores de diferenciação.

- Avaliar a capacidade das CTMs de capturar vesículas extracelulares utilizando meio condicionado de hepatócitos isolados de ratos com lesão.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Animais, aspectos éticos e tamanho amostral**

Para a realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos de 200 a 300 gramas, alimentados com ração e água *ad libitum*, em ciclo de sono vigília de 12 horas. Os mesmos foram mantidos em caixas/gaiolas com até 5 animais e em cama de maravalha com temperatura controlada de 22+/-1 °C e com exaustão do ar. Todos os procedimentos aplicados sobre os animais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP) (Projeto 14-0279) e seguiram as regulamentações de Uso e Cuidado dos Animais (Lei N° 11.794/08, normativas 12 e 13 do CONCEA assim como oitava edição do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animal* de 2011) sendo sempre executados sob a supervisão de pessoal qualificado. Foram solicitados 51 animais. Este número foi baseado na experiência prévia do grupo de trabalho levando em consideração a quantidade de células requeridas (CTMs e Hepatócitos) assim como a necessidade de realizar um n de três experimentos em triplicata para cada uma das técnicas aplicadas.

### **5.2 Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais**

Doadores de células (ratos Wistar pesando entre 200-300g) foram submetidos a eutanásia. As patas traseiras foram retiradas, os ossos (fêmur e tíbia) separados da massa muscular e levados para um ambiente estéril (capela de fluxo laminar). A seguir as epífises foram cortadas e a medula retirada utilizando-se uma seringa contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco®, USA). Depois de centrifugação a 2000 rotações por minuto (RPM) a medula óssea foi ressuspensa em 3 mL de meio enriquecido (DMEM + 20% Soro fetal bovino (SFB) + 1% Penicilina e

Estreptomicina (P/ E)) (Gibco®, USA) e colocada em contato com igual quantidade de FICOLL® (Sigma-Aldrich, Alemanha) para obtenção por gradiente de densidade, a FMMO (SIMON *et al.*, 2015). As células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com meio DMEM enriquecido em concentração 8 x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> permanecendo em condições padrão de cultura (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e atmosfera úmida) durante 3 dias para permitir a adesão das CTMs ao plástico.

Após 3 dias do isolamento da FMMO, a fração não aderente foi descartada, e as células aderentes foram cultivadas sempre em meio enriquecido e na condição padrão. Quando visualizadas as primeiras colônias celulares em crescimento, as células foram tripsinizadas (trypsin + 0.25% EDTA) (Gibco®, USA) e expandidas à razão de 1:2 em garrafas de 75cm<sup>2</sup>. Desse momento em diante, sempre que atingissem 70-80% de confluência as células eram repicadas e assim foram expandidas até a passagem 4.

### **5.3 Imunofenotipagem e diferenciação multilinhagem**

Na quarta passagem, foi feita a imunofenotipagem para caracterizar as CTMs através da análise de expressão de marcadores de superfície celular utilizando anticorpos específicos para os antígenos CD45, CD29, CD31 e CD90 (BD Biosciences, USA). Para a marcação, as células foram previamente tripsinizadas, fixadas em formol 2% e marcadas com anticorpo primário conjugado com FITC ou PE contra os antígenos descritos, segundo protocolo do fabricante. As células marcadas foram analisadas no Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, USA) (SIMON *et al.*, 2015).

A avaliação da característica multipotente das CTM foi feita através da indução da diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos utilizando meios prontos de

diferenciação StemPro® Kits (Gibco®, USA) respeitando as diretrizes do fabricante. A confirmação da diferenciação foi feita após duas semanas de tratamento através de colorações específicas, respectivamente: *Oil Red-O*, *Alcian Blue* e *Alizarin Red*. Tanto as células diferenciadas quanto os controles não suplementados foram fotografados utilizando microscópio invertido Olympus IX71 (Olympus, USA)

#### **5.4 Indução de lesão hepática aguda**

Foi utilizado como modelo experimental de IHA a administração de uma dose única de CCl<sub>4</sub>. Para isto, os ratos foram colocados em restrição alimentar no dia prévio. Minutos antes da administração uma dose de 1,25 mL/Kg de peso de uma solução de CCl<sub>4</sub> diluído em óleo de oliva foi preparada em capela de exaustão (BALDO *et al.*, 2010). Após ser misturado com o óleo de oliva, o CCl<sub>4</sub> pode ser manuseado com segurança fora da capela tornando-se pouco volátil. Previamente à administração da dose, via gavagem, foi coletada uma amostra de sangue.

#### **5.5 Caracterização do modelo de lesão**

A confirmação da lesão hepática foi avaliada macroscopicamente (“fígado em noz moscada”). Também em cada perfusão, uma biópsia foi coletada para análise histológica microscópica por coloração com HE. Antes da administração do CCl<sub>4</sub> e 24hs após foi coletado soro dos animais para análise das enzimas hepáticas: ALT e AST utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil) baseados no modo cinético, conforme as instruções do fabricante. O soro dos animais que não receberam tratamento prévio de CCl<sub>4</sub> também foi coletado e analisado seguindo os mesmos critérios.

## **5.6 Isolamento de hepatócitos**

Transcorridas 24 horas após a administração de CCl<sub>4</sub> nos ratos do grupo com lesão ou veículo no grupo saudável, foi coletada uma amostra de sangue e foram isolados os hepatócitos mediante perfusão do fígado com Colagenase II em duas etapas segundo o protocolo descrito anteriormente (SEGLEN, 1976) com modificações (RODRIGUES *et al.*, 2012). Os animais foram previamente anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (120 mg/kg) por via intraperitoneal. Na primeira etapa da perfusão, a veia porta foi canulada e perfundida com solução balanceada de Hank's (HBSS) e EDTA em fluxo de 700 mL/h controlado por uma bomba de infusão. Na segunda etapa, a perfusão foi realizada com uma solução de meio HBSS, Cloreto de Cálcio e Colagenase tipo II. Os antibióticos P/E 1% foram utilizados no preparo de todas as soluções. Em seguida o fígado foi retirado e transportado a uma capela de fluxo laminar estéril e cortado em pequenos fragmentos para dissociação do tecido. A suspensão de células foi filtrada em gaze estéril e centrifugada 4-5 vezes a 800 rpm por 5 minutos. Logo a viabilidade e o número dos hepatócitos foram determinados por Azul de Tripán em câmara de Neubauer. Os mesmos foram colocados em cultura em placa de 6 poços (3 x 10<sup>5</sup> hepatócitos/poço) recobertas com colágeno I, sendo mantidos com meio completo (DMEM, 10% SFB, 1%P/E) (Gibco®, USA) em condições normais de cultura durante 12hs.

Hepatócitos de animais sem lesão hepática prévia foram também obtidos e cultivados da mesma maneira descrita acima.

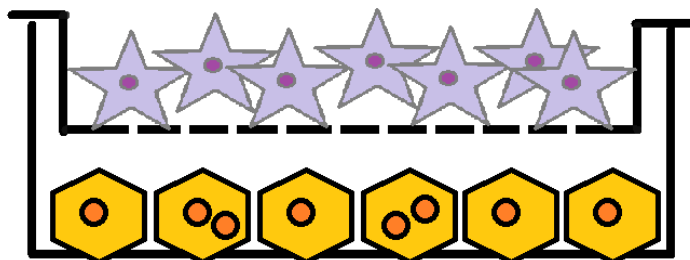
## **5.7 Coloração da membrana dos hepatócitos**

Com o objetivo de analisar a possível comunicação intercelular através da liberação de VEs, somente os hepatócitos do grupo de ratos tratados com CCl<sub>4</sub> foram

marcados logo após o isolamento com PKH26 (Sigma-Aldrich, Alemanha), um corante fluorescente vermelho que marca as membranas celulares. A confirmação da marcação foi dada pela análise mediante citometria de fluxo e por fotografia com microscópio invertido de fluorescência Olympus IX71 (Olympus, USA). Após a marcação, os hepatócitos foram plaqueados nas mesmas condições citadas anteriormente.

### 5.8 Modelo de co-cultivo e tempos de análise

CTMs na passagem 4 foram plaqueadas sobre insertos de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro (BD Biosciences, USA) em uma concentração de  $10^5$  células/inserto e mantidas em cultura por 24 hs. Após este tempo os insertos com as células foram colocados em placas de cultivo que já continham os hepatócitos semeados 12 hs antes. Assim, os hepatócitos ficaram na parte inferior e as CTMs na parte superior em condições normais de cultivo, com meio completo, durante 6 e 24 hs (Figura 6). Um total de quatro grupos foram testados: (1) CTMs em co-cultivo com hepatócitos de ratos saudáveis durante 6 hs; (2) CTMs em co-cultivo com hepatócitos de ratos saudáveis durante 24 hs; (3) CTMs em co-cultivo com hepatócitos de ratos lesados com  $\text{CCl}_4$  durante 6 hs; (4) CTMs em co-cultivo com hepatócitos de ratos lesados com  $\text{CCl}_4$  durante 24 hs.



**Figura 6.** Esquema mostrando a disposição das células no co-cultivo. CTMs por cima do inserto de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro e hepatócitos (normais ou lesados com  $\text{CCl}_4$ ) por baixo sobre uma superfície de colágeno.

## 5.9 Experimentos com meio condicionado

Para os experimentos com meio condicionado, somente hepatócitos isolados de ratos tratados com CCl<sub>4</sub> foram plaqueados (3x10<sup>5</sup>/poço) em cultura por 12 horas para aderir. A seguir o meio foi removido, os hepatócitos foram lavados gentilmente e foi adicionado meio completo, novamente permanecendo em cultura por 6 e 24 horas. Finalmente o meio condicionado foi coletado, centrifugado (800 rpm por 10 minutos) para descartar qualquer célula presente e diretamente transferido sobre CTMs. As CTMs ficaram em contato com o meio condicionado durante 6 e 24 horas respectivamente e em seguida foram coletadas para análise por RT-PCR, citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e medição de ureia. Os experimentos com meio condicionado foram realizados em dois grupos: (1) CTMs cultivadas com meio condicionado de hepatócitos de ratos lesados por CCl<sub>4</sub> durante 6 hs; (2) CTMs cultivadas com meio condicionado de hepatócitos de ratos lesados por CCl<sub>4</sub> durante 24 hs.

## 5.10 Análise de expressão gênica das células

Após os diferentes tempos de co-cultivo as CTMs foram tripsinizadas e foi extraído o RNA utilizando o *kit RNeasy* (Qiagen, Alemanha) e foi realizada a quantificação em *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, USA). O RNA foi convertido para cDNA utilizando o *kit SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA) seguindo as diretrizes do fabricante. A análise da expressão gênica foi feita por RT-PCR para avaliação da expressão dos genes hepáticos *Alb*, *Afp* e *Ck-18*, utilizando *Beta-Actina (b-Act)* como controle endógeno. A sequência de *primers* utilizada, temperatura de anelamento e tamanho do amplicon encontram-se detalhadas na Tabela 1.



**Tabela 1.** Detalhe das sequências de *primers* utilizadas, temperaturas de anelamento e tamanho do amplicon.

Gene	Sequência de <i>primers</i>	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento (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>Afp</i>	For: 5'CCCACCCTTCCACTTTCCAGA3' Rev: 5'GCTGGAAGTGCCTTGTCATA3'	60°C	164
<i>b-Act</i>	For: 5'CAAGATCATTGCTCCTCCTGAG3' Rev: 5'GACTCATCGTACTCCTGCTTGC3'	60°C	150

### 5.11 Análise de secreção de Ureia

As CTMs foram testadas quanto a sua capacidade de secretar ureia logo após os períodos de co-cultivo. Para isso, as CTMs foram colocadas em meio básico (DMEM) (Gibco®, USA). Após 24 h o meio de cultura foi coletado e centrifugado a 2000 RPM e a produção de ureia foi quantificada utilizando o *kit QuantiChrom™Urea Assay* (BioAssay Systems, USA) segundo instruções do fabricante. Hepatócitos em cultura isolados de ratos saudáveis foram utilizados como referência.

### 5.12 Extração de vesículas extracelulares

Para a extração das microvesículas um *pool* de sobrenadante de 3 poços por cada amostra foi coletado (CTMs, Hepatócitos normais, Hepatócitos lesados com CCl<sub>4</sub>, co-

cultivo de CTMs com hepatócitos normais e lesados às 6 e 24hs). O protocolo realizado, e descrito previamente (SIMON *et al.*, 2015), consistiu em uma primeira centrifugação a 2000 x g durante 20 minutos com a finalidade de remover qualquer célula e *debri* que puder estar no meio. Em seguida, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C utilizando uma ultracentrifuga Himac CP80WX (Hitachi, Japão). O pellet obtido foi analisado por citometria de fluxo e Zetasizer®.

### **5.13 Análise de marcação das vesículas extracelulares**

A análise de marcação de microvesículas liberadas por hepatócitos marcados com PKH-26 foi realizada utilizando o *Attune Acoustic Focusing Cytometer* (Applied Biosystems, USA). Antes de analisadas as amostras, o local da população das microvesículas foi determinado fazendo uso de *bead* (*Attune Performance Tracking Beads*) de tamanho conhecido (2.4 e 3.2µm) (Applied Biosystems, USA) conforme descrito previamente (BRUNO *et al.*, 2009).

### **5.14 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa *GraphPad Prism 6*. Dados contínuos foram demonstrados como média ( $\pm$  desvio padrão). Os dados contínuos foram comparados com teste *t* de *Student*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 REFERÊNCIAS

ABDEL-MISIH, S. R.; BLOOMSTRON, M. Nih public access. 2014. v. 90, n. 4, p. 643–653.

ARSLAN, F. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase atp levels, decrease oxidative stress and activate pi3k/akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem cell research**, May. 2013. v. 10, n. 3, p. 301–12.

AURICH, H. *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, Apr. 2009. v. 58, n. 4, p. 570–81.

AURICH, I. *et al.* Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. **Gut**, Mar. 2007. v. 56, n. 3, p. 405–15.

BAEKDAL M; YTTING H; LARSEN FS. Journal of hepatology and gastrointestinal disorders. 2016. v. 2, n. 3, p. 133.

BALDO, G. *et al.* Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after ccl(4) acute liver damage. **Digestive diseases and sciences**, Dec. 2010. v. 55, n. 12, p. 3384–92.

BANAS, A. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. **Hepatology**, 2007. v. 46, p. 219–228.

BAO, J. *et al.* Enhanced hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in spheroidal aggregate culture on a decellularized liver scaffold. **International journal of molecular medicine**, 2016. v. 38, p. 457–465.

BELARDINELLI, M. C. *et al.* Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. **Toxicology**, 2 May. 2008. v. 247, n. 1, p. 1–5.

BERNAL, W.; WENDON, J. Acute liver failure. **The new england journal of medicine**, 2013. v. 369, p. 2525–2534.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. **Advances in cancer research**, Jan. 2008. v. 100, n. 08, p. 133–58.

BORHANI-HAGHIGHI, M. *et al.* Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells by hepg2 cell line extract. **Iran J Med Sci**, 2015. v. 40, n. 2, p. 143–151.

BRUNO, S. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **J am soc nephrol**, 2009. v. 20, p. 1053–1067.

BRUNO, S.; DEREGIBUS, M. C.; CAMUSSI, G. The secretome of mesenchymal stromal cells: role of extracellular vesicles in immunomodulation. **Immunology letters**, 2015. v. 168, p. 154–158.

DAHLKE, M. H. *et al.* Stem cell therapy of the liver--fusion or fiction? **Liver transplantation : official publication of the american association for the study of liver diseases and the international liver transplantation society**, Apr. 2004. v. 10, n. 4, p. 471–9.

DALEY, G. Q. *et al.* Setting global standards for stem cell research and clinical translation: the 2016 isscr guidelines. **Stem cell reports**, 14 Jun. 2016. v. 6, n. 6, p. 787–97.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. **Cytherapy**, Jan. 2006. v. 8, n. 4, p. 315–7.

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. **The journal of experimental medicine**, 14 Mar. 2011. v. 208, n. 3, p. 421–8.

EIRIN, A. *et al.* Microrna and mrna cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Gene**, 2014. v. 551, p. 55–64.

FERREIRA, C. T. *et al.* Hepatitis a acute liver failure : follow-up of paediatric patients in southern brazil. 2008. v. 15, p. 66–68.

GOLDANI, H. A S. *et al.* The role of food restriction on ccl4-induced cirrhosis model in rats. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the gesellschaft für toxikologische pathologie**, Apr. 2007. v. 58, n. 5, p. 331–7.

GOMILLION, C. T.; BURG, K. J. L. Stem cells and adipose tissue engineering. **Biomaterials**, Dec. 2006. v. 27, n. 36, p. 6052–63.

JANG, Y. Y. *et al.* Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **Nature cell biology**, 2004. v. 6, p. 532–9.

LAI, R. C. *et al.* Exosome secreted by msc reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem cell research**, May. 2010. v. 4, n. 3, p. 214–22.

LAI, R. C.; YEO, R. W. Y.; LIM, S. K. Mesenchymal stem cell exosomes. **Seminars in cell & developmental biology**, 2015. v. 40, p. 82–88.

LANGE, C. *et al.* Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. **Transplantation proceedings**, 2005. v. 37, n. 1, p. 276–9.

LEE, W. M.; STRAVITZ, R. T.; LARSON, A. M. Introduction to the revised american association for the study of liver diseases position paper on acute liver failure 2011. **Hepatology (baltimore, md.)**, Mar. 2012. v. 55, n. 3, p. 965–7.

LI, T. Z. *et al.* Growth factor-free cultured rat bone marrow derived mesenchymal stem cells towards hepatic progenitor cell differentiation. **Biotechnology and bioprocess engineering**, 2008. v. 13, p. 659–665.

LI, T. Z. *et al.* Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats. **Tissue engineering. part a**, Aug. 2010. v. 16, n. 8, p. 2649–59.

LÓPEZ, M. L. *et al.* Platelet increases survival in a model of 90% hepatectomy in rats. **Liver international : official journal of the international association for the study of the liver**, Aug. 2014. v. 34, n. 7, p. 1049–56.

MANIBUSAN, M. K.; ODIN, M.; EASTMOND, D. A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. **Journal of environmental science and health. part c, environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews**, 2007. v. 25, p. 185–209.

MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. **Journal of cellular physiology**, Nov. 2007. v. 213, n. 2, p. 286–300.

MULCAHY, L. A. *et al.* Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. 2014. v. 1, p. 1–14.

MURACA, M. 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**, Mar. 2011. v. 43, n. 3, p. 180–7.

NADERI, N. *et al.* The regenerative role of adipose-derived stem cells (adsc) in plastic and reconstructive surgery. **International wound journal**, 1 Feb. 2016. p. 1–13.

ÖZERKAN, D.; ÖZSOY, N.; YILMAZ, E. Vitamin d and melatonin protect the cell's viability and ameliorate the ccl4 induced cytotoxicity in hepg2 and hep3b hepatoma cell lines. **Cytotechnology**, Dec. 2015. v. 67, n. 6, p. 995–1002.

PANACKEL, C. *et al.* Recent advances in management of acute liver failure. **Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of indian society of critical care medicine**, 2015. v. 19, p. 27–33.

PATEL, M.; TASKAR, K. S.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs and their metabolites. **Journal of clinical pharmacology**, Jul. 2016. v. 56 Suppl 7, p. S23–39.

POLSON, J.; LEE, W. M. Aasld position paper: the management of acute liver failure. **Hepatology (baltimore, md.)**, May. 2005. v. 41, n. 5, p. 1179–97.

QUESENBERRY, P. J. *et al.* Role of extracellular rna-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. **Stem cell research & therapy**, 3 Sep. 2015. v. 6, p. 153.

QUINTANA-BUSTAMANTE, O. *et al.* Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. **Hepatology**, 2006. v. 43, p. 108–116.

RODRIGUES, D. *et al.* Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. **Arquivos de gastroenterologia**, 2012. v. 49, p. 291–295.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem cells (dayton, ohio)**, 31 Mar. 2010. v. 28, n. 3, p. 585–96.

SANTORO, A. *et al.* Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. **Embo reports**, Dec. 2016. v. 17, n. 12, p. 1700–1720.

SARVANDI, S. S. *et al.* In vitro differentiation of rat mesenchymal stem cells to hepatocyte lineage. **Iran j basic med sci**, 2015. v. 18, n. 1, p. 89–97.

SECUNDA, R. *et al.* Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. **Cytotechnology**, Oct. 2015. v. 67, n. 5, p. 793–807.

SEGLÉN, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. **Methods in cell biology**, 1976. v. 13, p. 29–83.

SEO, M. J. *et al.* Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, 2005. v. 328, p. 258–264.

SHIOTA, G.; ITABA, N. Progress in stem cell-based therapy for liver disease. **Hepatology research : the official journal of the japan society of hepatology**, 18 May. 2016.

SIMON, L. **Diferenciação de células derivadas da medula óssea em células tipo-hepatócitos**. 109f. Dissertação (mestrado) - Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SIMON, L. *et al.* Injured hepatocyte-released microvesicles induce bone marrow-derived mononuclear cells differentiation. **Differentiation; research in biological diversity**, 2015. v. 90, n. 1-3, p. 40–7.

SNYKERS, S. *et al.* 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**, Dec. 2006. v. 94, n. 2, p. 330–41; discussion 235–9.

SNYKERS, S. *et al.* **Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming**. **Journal of hepatology**, Jul. 2009. v. 51(1): p. 187-211

SUN, K. *et al.* Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. **Scientific reports**, 29 Sep. 2014. v. 4, p. 6494.

SURANI, A.; TISCHLER, J. Stem cells: a sporadic super state. **Nature**, 2012. v. 487, p. 43–45.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, 2006. v. 126, p. 663–676.

TAKUMI, T. *et al.* Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. **Hepatology**, 2005.

TANAKA, M.; MIYAJIMA, A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. **Inflammation and regeneration**, 2016. p. 1–6.

TASDUQ, S. A. *et al.* Negundoside, an irridiod glycoside from leaves of vitex negundo, protects human liver cells against calcium-mediated toxicity induced by carbon tetrachloride. **World journal of gastroenterology**, 2008. v. 14, p. 3693–3709.

TERBLANCHE, J.; HICKMAN, R. Animal models of fulminant hepatic failure. **Digestive diseases and sciences**, 1991. v. 36, p. 770–774.

TURKSEN, K. Adult stem cells and cardiac regeneration. **Stem cell reviews**, Oct. 2013. v. 9, n. 5, p. 537–40.

URIBE CRUZ, C. *et al.* Bone marrow-derived mononuclear cells differentiate into hepatocyte-like cells within few hrs without fusion. **Journal of cell science & therapy**, 2014. v. 05.

URIBE-CRUZ, C. **Efeitos parácrinos da terapia celular em modelos de insuficiência hepática aguda utilizando microcápsulas semipermeáveis**. 135f . Tese (doutorado) - Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

URIBE-CRUZ, C. *et al.* Encapsulated whole bone marrow cells improve survival in wistar rats after 90% partial hepatectomy. **Stem cells international**, Jan. 2016. v. 2016, p. 4831524.

VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta biomaterialia**, Feb. 2011. v. 7, n. 2, p. 463–77.

VOSOUGH, M. *et al.* Cell-based therapeutics for liver disorders. **British medical bulletin**, 2011. v. 100, p. 157–172.

WU, X.-B.; TAO, R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international**, Aug. 2012. v. 11, n. 4, p. 360–371.

YINGJIE WANG, M. L. Mechanism of mscs differentiation into hepatocyte-like cells: the role of cytokines and chemical compounds. **Journal of stem cell research & therapy**, 2014. v. 04, n. 03.



ZHANG, Y.-N.; LIE, P.-C.; WEI, X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord wharton's jelly into hepatocyte-like cells. **Cytotherapy**, 2009. v. 11, p. 548–558.

## 7 ARTIGO

A seguir, os resultados serão apresentados no formato de artigo, segundo os requerimentos da revista *Stem Cell Research*.

**BM-MSCs uptake extracellular vesicles from CCl<sub>4</sub>-injured hepatocytes but do not differentiate into hepatocyte-like cells in 6 and 24 hours**

**Virginia Andrea Angiolini**, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Post-Graduation Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul. [vaangiolini@gmail.com](mailto:vaangiolini@gmail.com)

**Carolina Uribe Cruz**, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Post-Graduation Program in Gastroenterology, Federal University of Rio Grande do Sul. [carolinaurib10@yahoo.com.ar](mailto:carolinaurib10@yahoo.com.ar)

**Graziella Rodrigues**, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Post-Graduation Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul. [graziella.rrodrigues@gmail.com](mailto:graziella.rrodrigues@gmail.com)

**Laura Simon**, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. [laurasimon11@gmail.com](mailto:laurasimon11@gmail.com)

**Mónica Luján López**, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. [monicalujan.l@gmail.com](mailto:monicalujan.l@gmail.com)

**Ursula Matte\***: Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology and Post-Graduation Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul.

\*Corresponding author: Prof Ursula Matte, PhD, Gene Therapy Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS. CEP 90035-

903 Brazil. Telephone: +55-51-33597473; Fax: +55-51-33598010. E-mail: [umatte@hcpa.edu.br](mailto:umatte@hcpa.edu.br)

### **Abstract**

*Bone marrow (BM) derived cells were shown to differentiate into hepatocyte-like cells. It has been suggested that the transfer of extracellular vesicles (EVs) may be a mechanism involved in this process. Until now, differentiation capacity of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) mediated by EVs transfer, was not evaluated before 24 hours. The purpose of this study was to analyze in vitro differentiation potential of BM-MSCs by EV transfer mechanism in a short period of time (6 and 24 hours). Co-culture system using cell-impermeable membrane and conditioned medium experiments were used to explore the effects of healthy and injured hepatocytes over BM-MSCs differentiation. Hepatocyte profile on BM-MSCs was assessed by gene expression, PAS staining and urea release while EVs traffic was analyzed through flow cytometry. Results revealed that co-culture system is not adequate to assess EVs transfer between cells since no EVs were found on the upper chamber. On the other hand, conditioned medium experiment showed that BM-MSCs could uptake EVs but failed to differentiate into hepatocyte in a short time.*

### **Key words**

Bone marrow mesenchymal stem cell; cell differentiation; hepatocyte-like cell; extracellular vesicles; *in vitro* culture

## Introduction

Liver is a key organ for corporeal homeostasis maintenance (PATEL; TASKAR; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, 2016) and whole organ replacement still remains the gold standard procedure to treat acute liver failure (LEE, W. M.; STRAVITZ; LARSON, 2012). Liver transplantation has associated risks and immunosuppression dependence, which is costly and uncomfortable (WU, X.-B.; TAO, 2012). Moreover liver donors are not sufficient to attend all patients at the waiting list. Therefore, bone marrow (BM) cells have been investigated as a source for autologous cells transplantation, which have potential to differentiate into hepatocyte-like cells, thereby restoring liver function (LIU; CHANG, 2006; URIBE-CRUZ *et al.*, 2016).

BM is composed by a heterogeneous population of cells (BALDO *et al.*, 2010). *In vitro* studies, in which cell fusion mechanism is prevented, have demonstrated the differentiation capacity of BM cells fractions with the appearance of hepatocyte markers as early as 6 to 24 hours of co-culture (JANG *et al.*, 2004; SIMON *et al.*, 2015; URIBE CRUZ *et al.*, 2014). These studies suggest that injury environment is a strong stimulus for the appearance of early differentiation signals in cells. Simon *et. al* (2015) demonstrated that extracellular vesicles (EVs) released by healthy or injured hepatocyte carried differentially contents and EVs traffic was proposed as a mechanism to induce differentiation in BM-derived cells. EVs is a generic term to encompasses vesicles of different size (microvesicles and exosomes) and it has been shown that they have the ability to modulate the phenotype of neighboring cells (QUESENBERRY *et al.*, 2014).

To the best of our knowledge, the differentiation capacity of BM-MSCs fraction into hepatocyte-like cells has not been tested as early as 6 and 24 hours, even though scientific literature extensively support MSCs plasticity (AYATOLLAHI, Maryam *et*

*al.*, 2011; BORHANI-HAGHIGHI *et al.*, 2015; CHEN, Y. *et al.*, 2007; LEE, K.-D. *et al.*, 2004; SARVANDI *et al.*, 2015; WU, X.-B.; TAO, 2012). The present study evaluated the hypothesis of early differentiation of BM-MSCs into hepatocyte-like cells by EVs transfer mechanism, using a co-culture system and injured hepatocytes isolated from a murine model of acute liver failure.

## **Materials and Methods**

### *Animals and ethical aspects*

Male Wistar rats (200-300g) with 2 months were used for this study. All procedures applied to animals were previously approved by the Ethics Committee on Animal Research of Hospital de Clínicas of Porto Alegre (Project 14-0279) and were in agreement with the 8<sup>th</sup> Edition of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (National Research Council (US) Committee, 2011). The procedures were always executed under the supervision of qualified personnel.

### *BM-MSCs isolation and culture*

Animals were euthanized with a lethal dose of isoflurane anesthetics. Tibias and femurs were removed and transferred to an aseptic flow hood. Bone cavities were washed with Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco®, USA) to obtain whole bone marrow cells (WBM). Bone marrow mononuclear cells (BMMC) were isolated by Ficoll Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) density gradient centrifugation, in accordance with manufacturer's instructions and distributed on 25 cm<sup>2</sup> flask (~8x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>) with DMEM supplemented with 20% of fetal bovine serum (FBS; Gibco®, USA) and 1% of streptomycin and penicillin (S/P; Gibco®, USA). Cells were cultured for 72 hs in a humidified incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> (normal conditions).

After that, non-adherent fraction was removed and medium was replaced. Medium was changed twice a week and when cells achieved ~70-80% confluency, they were trypsinized (trypsin + 0.25% EDTA) (Gibco®, USA) and expanded (1:2) until the 4<sup>th</sup> passage.

#### *BM-MSCs characterization*

BM-MSCs at the 4<sup>th</sup> passage were collected for flow cytometry analysis and fixed in 2% formaldehyde. Cells were incubated with primary antibodies (1:100 v/v) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) (SIMON *et al.*, 2015). Cell-surface markers analyzed were CD29, CD90, CD45, and CD31 (BD Biosciences, USA). Events were collected on Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, USA) and analyzed by Attune® Cytometric Software v2.1.

BM-MSCs stemness properties were verified by treatment with StemPro® Kits (Gibco®, USA) differentiation medium for three of the mesoderm lineages (adipocyte, chondrocyte and osteocyte) in accordance with manufacturer's recommendations. Images were obtained with an inverted Olympus IX71 (Olympus, USA) microscope after staining the cells with Oil Red-O, Alcian Blue and Alizarin Red.

#### *Carbon Tetrachloride administration*

Acute liver failure was induced by Carbon Tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (Vetec, Brazil). Rats were food deprived for 12 hours and a blood sample was collected from retro-orbital plexus before administration. Blood was centrifuged (10 minutes at 4000 rpm) to collect serum for enzymatic test. A single dose of CCl<sub>4</sub> (1.25 mL/kg weight) diluted in olive oil was administered through gavage (BALDO *et al.*, 2010). Animals in the

control group received vehicle only. After 24 hours, a new sample of blood was collected for assessment of liver damage.

#### *Liver damage assessment*

Acute liver failure or healthy condition were confirmed by macroscopic liver appearance, liver biopsy stained with hematoxylin-eosin (HE), oil-Red O staining in isolated hepatocytes and serum measurements of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) by commercial kits (Labtest, Brazil) in accordance with manufacturer's recommendations.

#### *Hepatocyte isolation and culture*

Hepatocytes were isolated 24 hours after CCl<sub>4</sub> administration. Before beginning hepatocyte isolation, a biopsy was taken from each animal and fixed in 10% formaldehyde for histology analysis. Hepatocytes were then isolated from healthy animals or from rats with acute liver failure by the two-step perfusion method (SEGLEN, 1976) with modifications (RODRIGUES *et al.*, 2012). After isolation, hepatocytes were seeded on 6-well plates coated with type I collagen ( $3 \times 10^5$  cells/well) and cultivated in DMEM (Gibco®, USA) supplemented with 10% FBS (Gibco®, USA) and 1% P/S (Gibco®, USA) (complete medium) for 12 hours prior to co-culture experiments.

#### *Co-culture experiment*

With the purpose of studying differentiation capacity of BM-MSCs by healthy and injured hepatocyte and test the transfer of EVs released by injured hepatocytes we used a two-chamber co-culture system. Hepatocytes were placed in the lower chamber and BM-MSCs ( $10^5$  cells) seeded on 0.4 µm pore sizes co-culture inserts (BD

Biosciences) were placed in the upper chamber. For the co-culture experiment, medium was removed and hepatocytes were gently washed with 1X PBS. Complete medium was added to co-culture system and cells were maintained for 6 and 24 hours in normal growth conditions. After that, BM-MSCs were collected to RT-PCR analysis, flow cytometry, PAS staining and urea measurements.

#### *RNA extraction and RT-PCR analysis*

After co-culture periods, BM-MSCs were collected, washed with 1X PBS, and total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and quantified by NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). cDNA was synthesized using SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. To perform RT-PCR 200ng cDNA-templates were mixed with 2.5  $\mu$ L PCR buffer, 1.5 mM/ $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20 pmol of each primer, and 2U Taq DNA polymerase in 30  $\mu$ L of total volume. All reagents were from Invitrogen, USA. Samples were transferred to a thermocycler and the program used was one cycle at 95°C for 5 min, 35 cycles at 95°C for 45 sec, 47-60 °C for 50 sec and 72°C for 45 sec and one final cycle of 72 °C for 7min. Annealing temperatures and primers used were (1) b-Actin (*b-Act*): 60 °C; *For* 5'CAAGATCATTGCTCCTCCTGAG3', *Rev* 5'GACTCATCGTACTCCTGCTTGC3', (2) Citoqueratin-18 (*Ck-18*): 58 °C, *For* 5'GGACCTCAGCAAGATCATGGC3', *Rev* 5'CCAGGATCTTACGGGTAGTTG3', (3) Albumin (*Alb*): 47 °C, *For* 5'GGTATGAATATGCAAGAAG3', *Rev* 5'CACTCTTCCCAGGTTTCTTG3', (4) Alpha-fetoprotein (*Afp*): 60 °C, *For* 5'CCCACCCTTCCACTTTCCAGA3', *Rev* 5'GCTGGAAGTGCCTTGTCATA3'.

RT-PCR products were visualized in 1.5% agarose gel stained with SYBR® Safe Nucleic Acid Stain (Invitrogen, USA) and gel images were captured using the



photo documentation system L-Pix Chemi Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, Brazil).

#### *Periodic acid-Shiff staining*

After co-culture times, BM-MSCs were collected and fixed in 2% formaldehyde. Cells were transferred to histological slides by cytospin centrifugation and periodic acid-Shiff (PAS) staining was performed to assess glycogen storage.

#### *Hepatocyte membrane labeling*

Experiments to track EVs required hepatocyte membrane labeling after isolation and before seeding. PKH-26 (Sigma-Aldrich), a red fluorescent dye which intercalate in lipid bilayers, was used in accordance to manufacturer's recommendations. Labeling of cells was determined by flow cytometry and fluorescence microscopy (Olympus IX71, Olympus, USA).

#### *EVs isolation*

EVs were isolated from supernatant of marked injured hepatocyte cultured alone and from the lower and upper chamber of co-culture systems at 6 and 24 hours. The presence of EVs in supernatant medium was assessed as described (SIMON *et al.*, 2015). Briefly, medium was collected and centrifuged to remove debris (2000 g for 20 min). After that, cell-free supernatants were ultracentrifuged (100,000 g, 1 h, 4 °C) in a HIMAC CP80WX ultracentrifuge (Hitachi, Japan). The pelleted materials were used to EVs characterization.

#### *EVs characterization and traffic assessment*

EVs were analyzed by flow cytometry using Attune Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). To determine the gating parameters, Attune Performance Tracking Beads (2.4 and 3.2  $\mu$ m, Applied Biosystems) were used as size markers (SIMON *et al.*, 2015). BM-MSCs were also analyzed by flow cytometry to determine hepatocyte-derived PKH-26 marker incorporated by EVs uptake.

To determine EVs zeta potential, the ultracentrifuged pellet were diluted in 1X PBS and analyzed with Zetasizer NZ50 (Malvern Instruments, Great Britain).

#### *Conditioned medium experiments*

For experiments using conditioned medium, hepatocytes ( $3 \times 10^5$ /well) from injured rats were seeded and cultured for 12 hours to adhere. Then, medium was removed, hepatocytes were gently washed and fresh complete medium was added. After 6 and 24 hours medium was collected, centrifuged (800 rpm for 10 minutes) to discard any remaining cell and transferred to previously seeded BM-MSCs. After 6 and 24 hours BM-MSCs were collected to RT-PCR analysis, flow cytometry, fluorescence microscopy and urea measurements.

#### *Urea quantification*

Urea assay was performed to evaluate hepatic function of BM-MSCs after co-culture with healthy and injured hepatocytes, and after culture with conditioned medium. For co-culture experiments, co-culture inserts were transferred to a different well containing fresh basic medium only. For conditioned medium experiments, BM-MSCs were gently washed and fresh basic medium was added. After 24 hours, medium was collected to assess urea release by Quanti-Chrom™ Urea Assay Kit (DIUR-100,

BioAssay Systems, USA), in accordance to the manufacturer's instructions. Healthy hepatocytes were used as positive control.

### *Immunofluorescence*

After conditioned medium experiments, BM-MSCs cells were collected, fixed in 2% formaldehyde for 20 min and transferred to histological slides by cyospin centrifugation (1000rpm for 5 minutes). Immunofluorescence for albumin was carried out using sheep polyclonal antibody 1:400 (Abcam, UK) with secondary rabbit anti-sheep IgG-FITC 1:400 (Sigma-Aldrich, USA) as described by Simon et al. (2015).

### *Statistical analysis*

Results are expressed as means +/- SD. Student's t-test used to comparison were performed with GraphPad Prism 6 software. Results were considered statistically significant if p-value < 0.05.

## **Results**

### *Characterization of BM-MSCs*

BM-MSCs were successfully isolated and expanded. At 2<sup>nd</sup> passage most cells already had the characteristic fusiform shape and only few of them had a rounded shape. At 4<sup>th</sup> passage BM-MSCs were analyzed by flow cytometry and it revealed that most cultured cells expressed CD29 and CD90 (93.03% and 89.44% respectively). Also, the expression of hematopoietic and endothelial markers was reduced, as only 2.45% of cells were positive for CD45 and 0.23% for CD31 (Figure 1-A). Multipotent lineage differentiation assay was performed at the same passage. In the presence of defined differentiation media, cells changed their morphology and showed features of adipocyte,

osteocyte and chondrocyte whereas in the absence of differentiation media they remained with the same fusiform morphology (Figure 1-B).

#### *Assessment of acute liver injury*

Effectiveness of CCl<sub>4</sub> administration and occurrence of acute liver injury was assessed through macroscopic organ appearance, liver biopsy with HE staining and serum analysis of hepatic enzymes. All signals confirmed that administration of a single dose of 1.25 mL/Kg was adequate to cause acute liver damage. Injured livers had visual macroscopic white points (nutmeg liver) and presented apoptosis, severe cell ballooning and steatosis under microscopic analysis. Serum levels increased from 38.65 +/- 6.36 U/L to 345.52 +/- 138.34 U/L (p=0.0128) for ALT and 104.19 +/- 18.03 U/L to 537.68 +/- 82.38 U/L for AST (p=0.0005) (Figure 2).

#### *Co-culture assay*

The effect of injured hepatocytes in BM-MSC cells was studied *in vitro* in a co-culture system. Hepatocytes from healthy or CCl<sub>4</sub>-treated animals were plated in collagen I coated wells whereas BM-MSCs were distributed on 0.4 µm pore inserts. Both cell types were confirmed to adhere and maintain their usual morphology prior to the start of co-culture assays (Figure 3-A).

Co-cultured BM-MSCs for 6 and 24 hours, showed no expression of hepatocyte-like genes *Ck-18*, *Alb* and *Afp*, even after exposure to damaged microenvironment (Figure 3-B). PAS staining of BM-MSCs also showed no differences between the co-cultured conditions tested when compared to negative control (isolated culture of BM-MSCs) (Figure 3-C). Urea concentrations measured in culture medium of BM-MSCs after co-culture times confirmed the lack of differentiation signs in BM-MSCs under

these conditions. The measured values of urea production in co-cultured BM-MSCs were significantly lower (0.42 +/- 0.01 mg/dL at 6 hours and 0.50 +/- 0.04 mg/dL at 24 hours) than the concentration measured in the medium of healthy hepatocytes used as positive control (6.00 +/- 0.45 mg/dL) (Figure 3-D).

#### *Injured hepatocytes release EVs in vitro*

In order to verify if intercellular communication through the release of EVs was occurring (Figure 4), hepatocytes isolated from CCl<sub>4</sub> treated animals were marked with traceable PKH-26 fluorescent membrane dye. At 12 hours after seeding these cells were photographed (Figure 5-A) and analyzed by flow cytometry, which showed ~96% PKH-26 positive cells (Figure 5-B). EVs isolated from the supernatant of injured PKH-26 positive hepatocytes were also analyzed by flow cytometry. At 6 and 24 hours after seeding, a similar percentage of positive PKH-26 EVs was released from marked hepatocytes (58.5% and 56.1%, respectively, Figure 5-C). The presence of membrane-enclosed vesicles was also confirmed by the Zeta potential measured in EVs. It was -24.97mV +/- 0.62, which is representative of cell membrane potential in physiological conditions.

#### *EVs tracking in co-culture environment*

Since no signs of differentiation were observed in BM-MSCs even when co-cultured with injured hepatocytes and these have been shown to release EVs, we hypothesized that the EVs were not reaching the BM-MSCs. Medium from the lower and upper chamber of co-culture system were collected at 6 and 24 hours of co-culture with injured hepatocytes and analyzed for the presence of PKH-26 positive EVs. Flow cytometry results revealed a percentage of positive EVs at the lower chamber comparable to that found for hepatocytes cultured alone (60.68% at 6 hours and 55.11%

at 24 hours, Figure 6-A and 6-B). Interestingly, when the upper chamber was analyzed, PKH-26 positive EVs, derived from hepatocytes, were barely detectable at any time point (0.07% at 6 hours and 0.04% at 24 hours, Figure 6-C and 6-D). To discard that this fact was due to EVs uptake by BM-MSCs at the upper chamber, these cells were also collected and analyzed by flow cytometry (Figure 4). Again, no PKH-26 positive BM-MSCs were detectable at any time point (Figure 6-E and 6-F) suggesting the absence of EVs transfer from the lower to the upper chamber.

*BM-MSCs cultured with injured hepatocytes conditioned medium capture EVs*

Finally, we tested BM-MSCs capacity to uptake hepatocyte-derived EVs and their response to it. For that, culture medium from injured PKH-26 positive hepatocytes only, was collected at 6 and 24 hours, centrifuged and directly transferred to BM-MSCs cultured alone. After 6 and 24 hours of culture in conditioned medium, it was removed and BM-MSCs were collected for flow cytometry analysis. A small percentage of positive cells was found after culture with conditioned medium (2.28% at 6 hours and 3.97% at 24 hours, Figure 6-G and 6-H). Also, fluorescence microscopy revealed red points in BM-MSCs indicating PKH-26 presence in these cells (Figure 7-A). Interestingly, detection of albumin by immunofluorescence in the cells that received conditioned media showed that albumin had the same subcellular localization as the PKH-26 positive vesicles. Altogether, these findings suggest that BM-MSCs incorporate EVs from the conditioned medium of injured hepatocytes, which seemed to contain albumin (Figure 7-B).

These results indicate that BM-MSCs uptake EVs, consequently we tested if this uptake had any effect on differentiation. Gene expression and urea assay were carried out for BM-MSCs cultured with conditioned medium. No amplification was detected

for hepatocyte markers with conventional PCR and urea assay showed comparable results with those of BM-MSCs co-cultured with hepatocytes (0.35 +/- 0.06 mg/dL at 6 hours and 0.33 +/- 0.03 mg/dL at 24 hours) indicating absence of urea release.

## **Discussion**

In the last decade the interest for alternative hepatocyte sources to treat patients with liver failure has increased, even though liver replacement still remains the gold standard procedure (LEE, W. M.; STRAVITZ; LARSON, 2012). BM has captivated researchers' attention as an excellent source for autologous cells, since they are easy to obtain and showed promising results (URIBE-CRUZ *et al.*, 2016). Transdifferentiation has been proposed to be a mechanism of action for BM-derived cells (LIU; CHANG, 2006).

*In vitro* studies have focused on investigating the differentiation capacity of separated fractions of BM cells. Previous studies of our group observed that microencapsulated bone marrow mononuclear cells (BMMCs) expressed *Alb* and secrete urea 6 hours after co-culture with hepatocytes injured by CCl<sub>4</sub> (URIBE CRUZ *et al.*, 2014). Jang *et al.* (2004) saw similar results in a short period of time (8 hours) when hematopoietic stem cells (HSCs) were co-cultured with injured liver cells (JANG *et al.*, 2004). Simon *et al.*, 2015 described that the non-aderent fraction of BM (NAD-BM), which contain HSCs, exhibit a hepatocyte-like cell profile when co-cultured with injured CCl<sub>4</sub> hepatocytes for 24 hours but not when co-cultured with normal hepatocyte (SIMON *et al.*, 2015). All these studies support the idea that an injury environment is a strong stimulus for the appearance of early differentiation signals in cells.

Up to now, no studies focusing specifically on BM-MSCs fraction have tested differentiation capacity of these cells in a short period of time. A wide scientific

literature collected during the last decade support BM-MSCs plasticity to turn into hepatocyte-like cell. Most common procedures use growth factors, cytokines and chemical compounds mixtures for long periods in culture (AYATOLLAHI, Maryam *et al.*, 2011; LEE, K.-D. *et al.*, 2004; WU, X.-B.; TAO, 2012), which could be tumorigenic and not recommended for patients treatment (Li *et al.*, 2010). Experiment using conditioned medium from healthy hepatocytes were also effective to differentiate BM-MSCs and MSCs from other sources if long periods of culture are applied (BORHANI-HAGHIGHI *et al.*, 2015; CHEN, Y. *et al.*, 2007; SARVANDI *et al.*, 2015). However, these long term procedures are not useful for treating patients with acute liver failure.

Recent studies have proposed that EVs (term which enclose microvesicles and exosomes) can modulate the phenotype of neighboring cells (QUESENBERRY *et al.*, 2014). The interest of EVs in cell-to-cell communication grew after discovery that it carry RNA, including microRNA (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). It was also suggested that injury environment promote EVs release from damaged hepatocytes and that these EVs carry different contents when compared to EVs released by healthy hepatocytes (SIMON *et al.*, 2015). This conclusion support the idea that EVs transfer could be a differentiation mechanism for NAD-BM cells *in vitro* in only 24 hours (SIMON *et al.*, 2015).

The present study evaluated the hypothesis of early differentiation of BM-MSCs in hepatocyte-like cells by EVs transfer mechanism, with the same strategy previously used by Simon *et al.* (2015). However, we found out that the co-culture system may not be useful for this kind of experiments. We have shown the absence of EVs traffic between the lower and the upper chamber of co-culture system with only 0.07 and



0.04% of positive EVs found at 6 and 24 hours at the upper chamber. This is much lower than the results obtained by Simon et al., (2015), that could recover more than 5% of positive EVs from the upper chamber. This difference can be explained by the fact that in the present study adherent cells form a uniform layer that covers the membrane pore (which would normally permit the passage of EVs lower than 0.4  $\mu\text{m}$ ) while Simon et al., 2015 used non-adherent cells. Nevertheless, it is difficult to think that BM-MSCs physically blocked the passage of absolutely all EVs released by hepatocytes and it may be more acceptable the idea that BM-MSCs are limiting the size of EVs passing into the upper chamber but the ultracentrifugation procedure used to isolate EVs (100,000 g for 60 min) is accepted for EVs larger than 100 nm (PAP *et al.*, 2009). Possibly, the EVs population present on the upper chamber was too small and could not be recovered to be analyzed.

It is also know that EVs transfer could be bidirectional between stem cells and tissue injured cells (QUESENBERRY *et al.*, 2015). We cannot rule out that maybe the flow of EVs from the upper to the lower chamber was more accentuate and predominated and even that the quantity of EVs released by MSCs (that are not marked) masked the marked hepatocyte-derived EVs. This hypothesis should be tested by future studies tracking both BM-MSCs- and hepatocyte- derived EVs.

Another important remark is the absence of BM-MSCs marked with PKH-26, that would suggest uptake of EVs by BM-MSCs. In contrast with Simon et al., 2015, which found ~1% of marked cells, in this study no presence of marked BM-MSCs was observed in co-culture experiments. It would not be necessary that EVs pass through the upper chamber to be captured by BM-MSCs if these cells can uptake the vesicle immediately when it is trying to pass through the pore. Different mechanisms to

internalize EVs have been proposed, such as endocytosis, phagocytosis, macropinocytosis or lipid rafts, and specific protein–protein interactions, like heparin sulphate proteoglycans that help EVs to entry into cells (CHRISTIANSON *et al.*, 2013; MULCAHY *et al.*, 2014). It is possible that direct uptake was disabled because pseudopods formation would need more space or because specific regions that engulf the particle were not coincident with pore location.

Therefore it was necessary to use an alternative approach, in which EVs were definitely in contact with BM-MSCs in order to test if they could differentiate in a short period of time. This fact was finally probed by conditioned medium experiments which demonstrated that BM-MSCs really capture and internalize hepatocyte-derived EVs. A small and timely dependent percentage of mark BM-MSCs was found by flow cytometry analysis as well as red points could be observed under fluorescence microscopy. Simon *et al.*, 2015 verified that cultured hepatocyte from injured rats release EVs carrying *Alb*. In contrast with this previous work, *Alb* expression was not detected in BM-MSCs after cultured with conditioned medium for a short period of time (6 and 24 hours). Of course, the use of conditioned medium has different dynamics than that of co-culture. It was necessary to recover all EVs released to the supernatant and then transfer them to BM-MSCs in contrast to a co-culture environment where it is expected that EVs are released and captured immediately. Therefore our results may suggest that transfer of rat mRNA through EVs is a rapid process followed by degradation. However, epigenetics changes triggered by microRNAs can be introduced on target cells to produce *de novo* mRNA transcription (ALIOTTA, J. M. *et al.*, 2012) but probably these changes take longer to occur. So, one cannot assume if epigenetics changes, which could be observed later, take place in the present study.

## **Conclusion**

In this study we showed that co-culture microenvironment is not adequate to promote EVs transfer between hepatocytes and BM-MSCs separated by a pore membrane. For some reason EVs do not pass through the lower to the upper chamber. On the other hand, we can suggest that BM-MSCs have capacity to uptake hepatocyte-derived EVs but this does not lead to hepatocyte-like profile in a short period of time like seen for other bone marrow derived cells. More studies will be necessary to clarify the dynamic of EVs transfer and the physical or biological conditions interfering in this process.

## **Abbreviations**

*Afp*: Alpha-fetoprotein; *Alb*: Albumin; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; *b-act*: Beta-actin; BM: Bone marrow; BMNCs: bone marrow mononuclear cells; BM-MSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; CCl<sub>4</sub>: carbon tetrachloride; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; EVs: Extracellular vesicles; FITC: Fluorescein isothiocyanate; HSCs: Hematopoietic stem cells; NAD-BM: Non-adherent bone marrow fraction; PAS: Periodic acid-Schiff; PE: Phycoerythrin; S/P: Streptomycin/Penicillin; WBM: Whole bone marrow

## **Ethic approval and consent to participate**

Animals used for this study were manipulated in accordance with ethics regulations and all procedures were previously approved by a specific institutional ethic committee and executed over specialist veterinarian supervision (Reference project: 14-0279).

## **Consent for publication**

Not applicable

### **Availability of data and materials**

All data generated and analyzed during this study are included in this published article

### **Competing interests**

Funding institutions have no role in study design, data collection, data analysis and interpretation, article writing or submitting decision for publication. The authors declare no competing interests.

### **Funding**

This study was supported by FIPE/HCPA. VAA and UM are recipients of CAPES and CNPq scholarships, respectively.

### **Authors' contributions**

VAA carried out experiments, analyzed data and wrote the manuscript. UM contributed with study design, data analysis, request for funding and critical revision of the manuscript. CUC, LS, GR and MLL and contributed with data analysis and revision of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

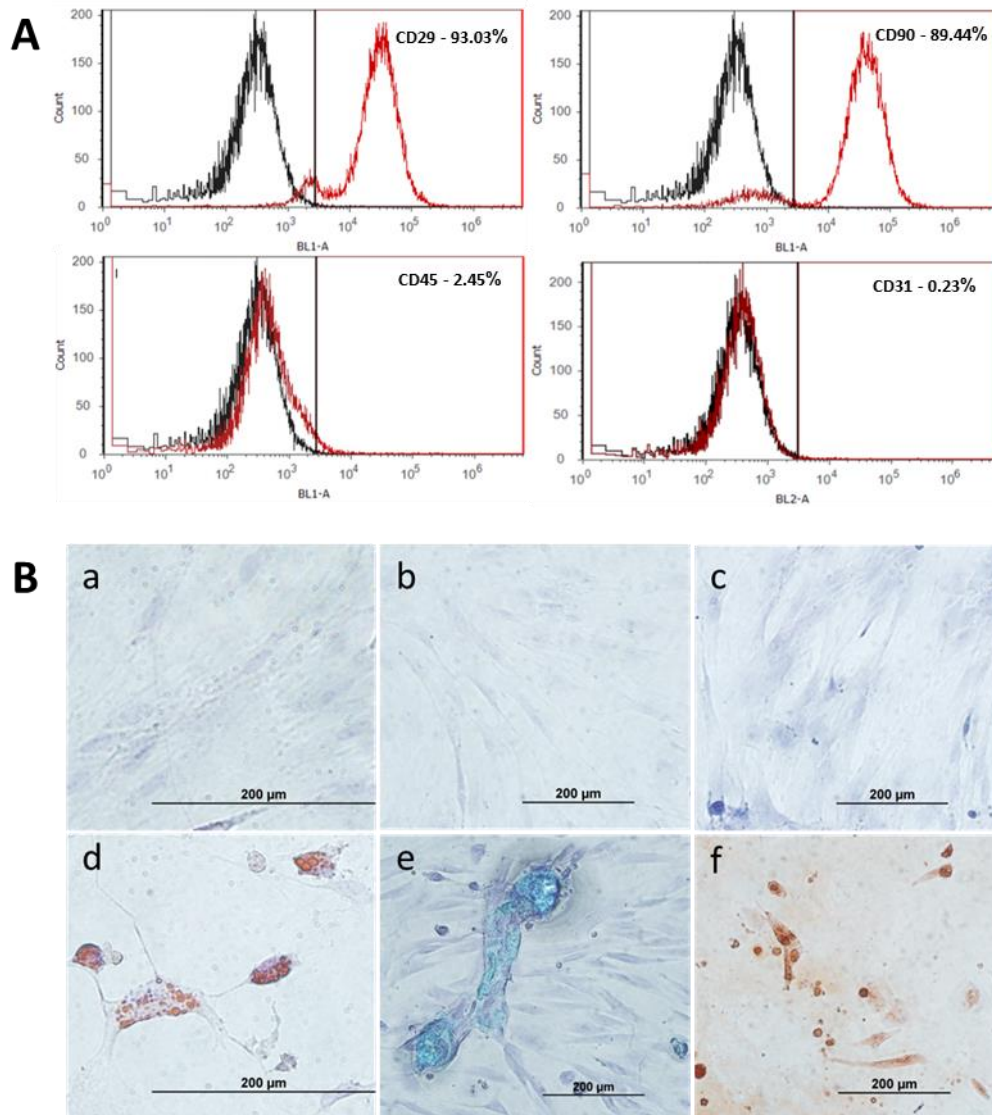
We would like to thank Fabrício Figueiró for providing us with the ultracentrifugation tubs used in this study and Santiago Tobar to help with ultracentrifuge manipulation.

## Bibliography

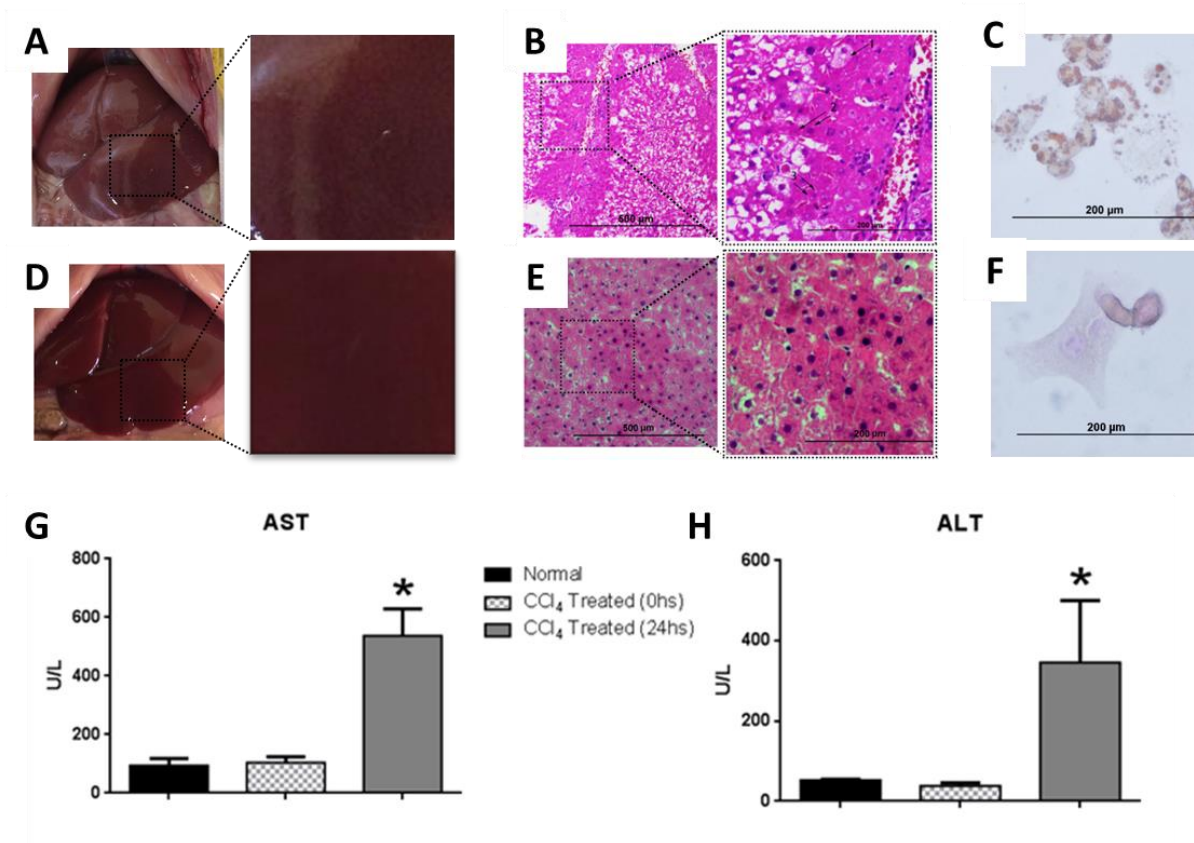
- Aliotta, J.M. et al., 2012. Stable cell fate changes in marrow cells induced by lung-derived microvesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1, pp.1–14.
- Ayatollahi, M. et al., 2011. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. *World journal of stem cells*, 3(12), pp.113–21.
- Baldo, G. et al., 2010. Bone marrow mononuclear cell transplantation improves survival and induces hepatocyte proliferation in rats after CCl<sub>4</sub> acute liver damage. *Digestive diseases and sciences*, 55(12), pp.3384–92.
- Borhani-Haghighi, M. et al., 2015. Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells by HepG2 cell line extract. *Iran J Med Sci*. 2015, 40(2), pp.143–151.
- Chen, Y. et al., 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(1), pp.52–63.
- Christianson, H.C. et al., 2013. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. , 110(43).
- Jang, Y.Y. et al., 2004. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature cell biology*, 6, pp.532–9.
- Lee, K.-D. et al., 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(6), pp.1275–84.
- 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), pp.965–7.
- Li, T.Z. et al., 2010. Therapeutic potential of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated with growth-factor-free coculture method in liver-injured rats. *Tissue engineering. Part A*, 16(8), pp.2649–59.
- Liu, Z.C. & Chang, T.M.S., 2006. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 12(4), pp.566–72.
- Mulcahy, L.A. et al., 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. , 1, pp.1–14.

- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Pap, E. et al., 2009. Review Highlights of a new type of intercellular communication : microvesicle-based information transfer. , 58, pp.1–8.
- Patel, M., Taskar, K.S. & Zamek-Gliszczyński, M.J., 2016. Importance of Hepatic Transporters in Clinical Disposition of Drugs and Their Metabolites. *Journal of clinical pharmacology*, 56 Suppl 7, pp.S23–39.
- Quesenberry, P.J. et al., 2014. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations. *Stem cells and development*, 23(13), pp.1429–36.
- Quesenberry, P.J. et al., 2015. Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem cell research & therapy*, 6, p.153.
- Rodrigues, D. et al., 2012. Freshly isolated hepatocyte transplantation in acetaminophen-induced hepatotoxicity model in rats. *Arquivos de Gastroenterologia*, 49, pp.291–295.
- Sarvandi, S.S. et al., 2015. In vitro differentiation of rat mesenchymal stem cells to hepatocyte lineage. *Iran J Basic Med Sci*, 18(1), pp.89–97.
- Seglen, P.O., 1976. Preparation of Isolated Rat Liver Cells. *Methods in Cell Biology*, 13, pp.29–83.
- Simon, L. et al., 2015. Injured hepatocyte-released microvesicles induce bone marrow-derived mononuclear cells differentiation. *Differentiation; research in biological diversity*, 90(1-3), pp.40–7.
- Uribe Cruz, C. et al., 2014. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells Differentiate into Hepatocyte-Like Cells within Few Hrs without Fusion. *Journal of Cell Science & Therapy*, 05.
- Uribe-Cruz, C. et al., 2016. Encapsulated Whole Bone Marrow Cells Improve Survival in Wistar Rats after 90% Partial Hepatectomy. *Stem cells international*, 2016, p.4831524.
- Wu, X.-B. & Tao, R., 2012. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 11(4), pp.360–371.
- Yáñez-Mó, M. et al., 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, pp.1–60.

## Figures

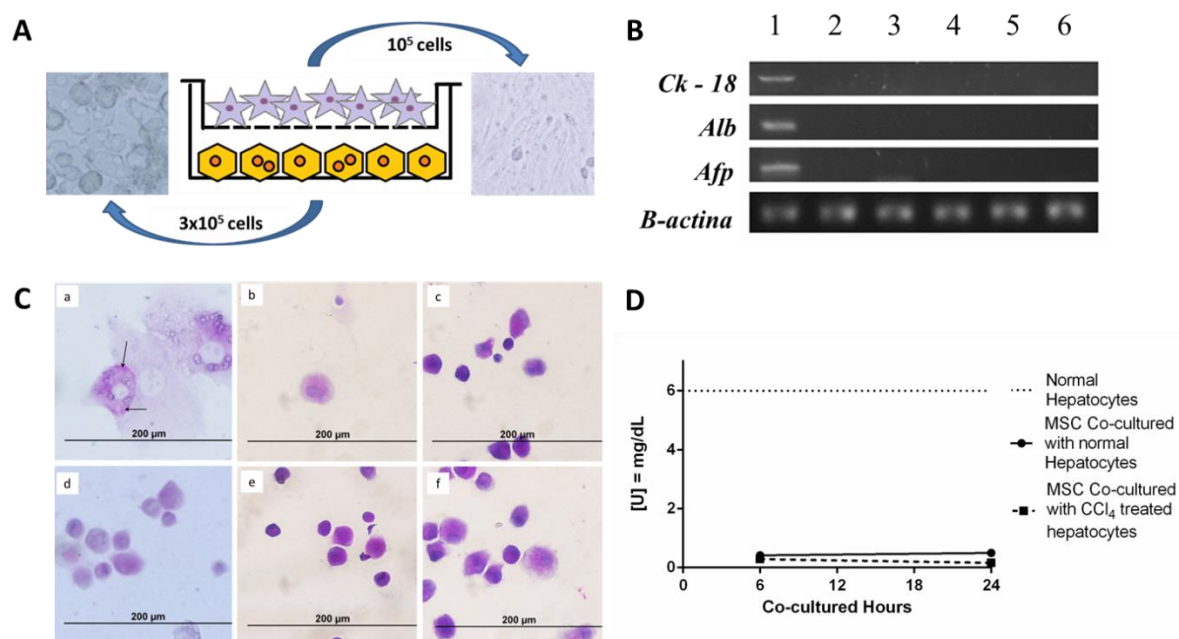


**Figure 1.** BM-MSCs characterization. (A) Immunophenotype (4th passage). Histograms show flow cytometry analysis of BM-MSC positive for CD29 and CD90 markers while negative for CD45 (hematopoietic marker) and CD31 (endothelial marker). (B) Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation capacity of BM-MSCs at 4<sup>th</sup> passage. Cells cultivated with basic medium remained with MSC characteristics (a, b and c) while cells exposed to differentiation treatment become adipocyte (d), chondrocyte (e) and osteocyte (f) as revealed by lipid droplets, glycosaminoglycans and calcium deposition respectively, stained by Oil Red O, Alcian Blue and Alizarin Red. Magnification 200X.

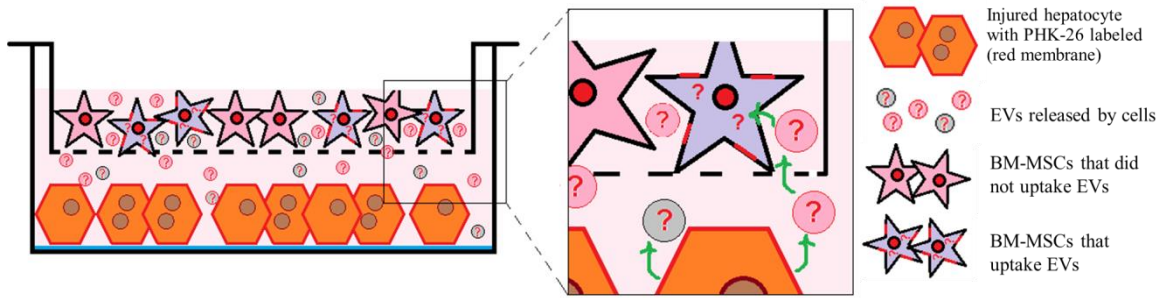


**Figure 2.** Hepatic injury characterization. Liver of CCl<sub>4</sub> treated rats presented damage signals 24 hours after drug administration. Injury was seen both, macro and microscopically and by serum markers analyzed. (A) Macroscopic photograph of CCl<sub>4</sub> treated liver rat with characteristic nutmeg appearance. (B) HE staining of CCl<sub>4</sub> treated liver biopsy (20X) which presents severe cell ballooning, apoptosis and steatosis (showed by 1, 2 and 3 respectively at higher augment – 40X). (C) Oil-Red staining of CCl<sub>4</sub> treated hepatocytes 24 hours after seeding. (D) Macroscopic photograph of normal liver with homogeneous and dark red coloration. (E) HE staining of normal liver biopsy without signs of injury in hepatic parenchyma (F) Oil-Red staining of normal hepatocytes 24 hours after seeding. (G) AST serum measurement. (H) ALT serum measurement. \*p<0.05

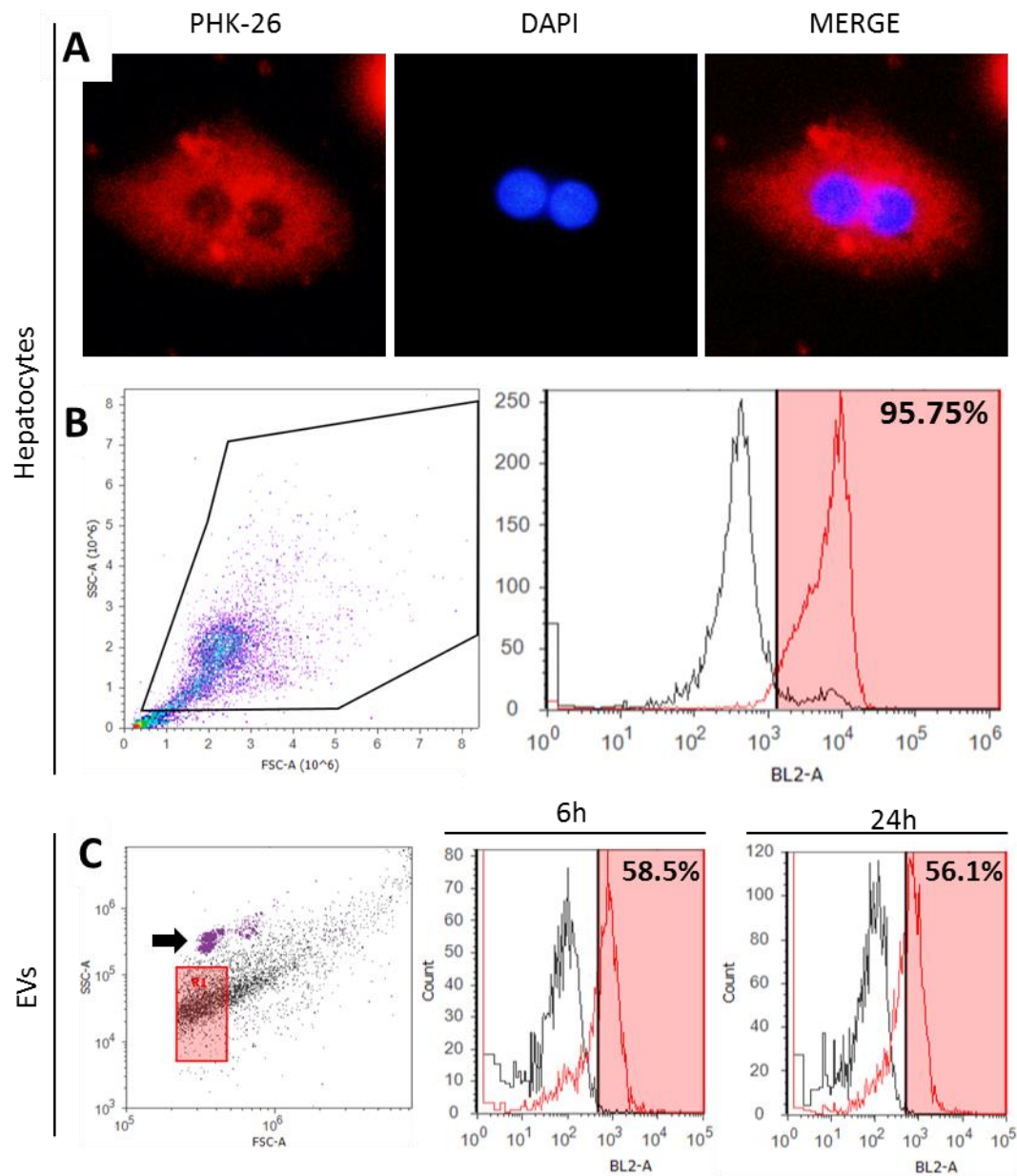




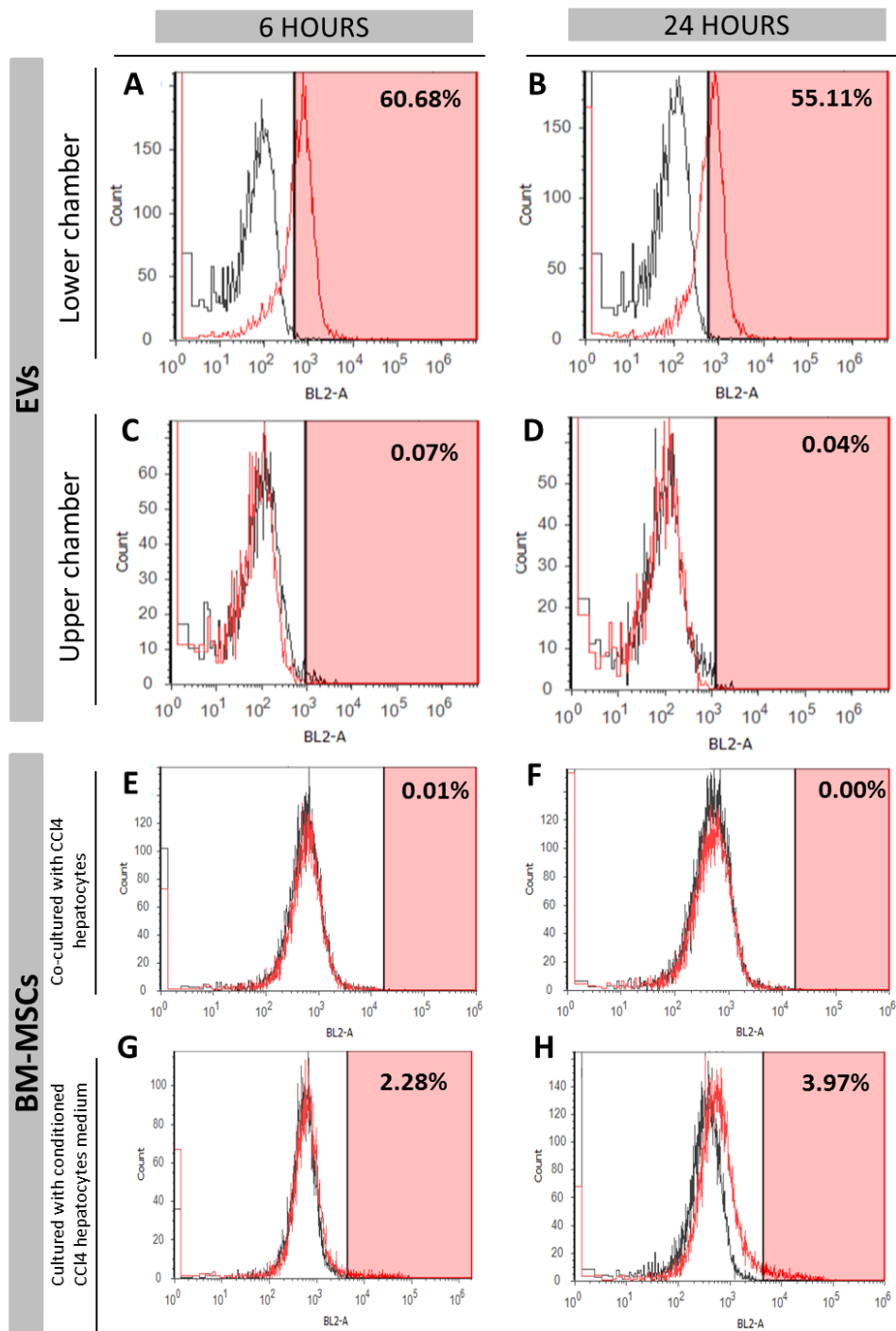
**Figure 3.** BM-MSCs co-cultured with normal and injured hepatocyte for 6 and 24h. (A) Diagram of co-culture system. Healthy or injured hepatocytes were platelet on collagen-coated wells 12 hours before co-culture. After this time hepatocytes adhere and have typical hexagonal morphology and presence of bi-nucleated cells (left photograph). BM-MSCs were platelet on 0.4 $\mu$ m inserts 24h before co-culture assay. Cells covered the surface and showed fusiform shape (right photograph). (B) RT-PCR using 100ng of cDNA as template. 1– normal hepatocytes (NH); 2– negative control (BM-MSCs); 3– BM-MSCs co-cultured with NH for 6h; 4– BM-MSCs co-cultured with NH for 24h; 5– BM-MSCs co-cultured with IH (injured hepatocytes) for 6h; 6– BM-MSCs co-cultured with IH for 24h. (C) PAS staining. (a) NH showing glycogen storage (arrows); (b) BM-MSCs co-cultured with NH for 6h; (c) BM-MSCs co-cultured with NH for 24h; (d) (-); (e) BM-MSCs co-cultured with IH for 6 hours; (f) BM-MSCs co-cultured with IH for 24 hours. (D) Urea release assessment in supernatant of cultured cells. After 6 and 24 hours of co-culture with NH or IH, no increase in urea production was detected in BM-MSCs.



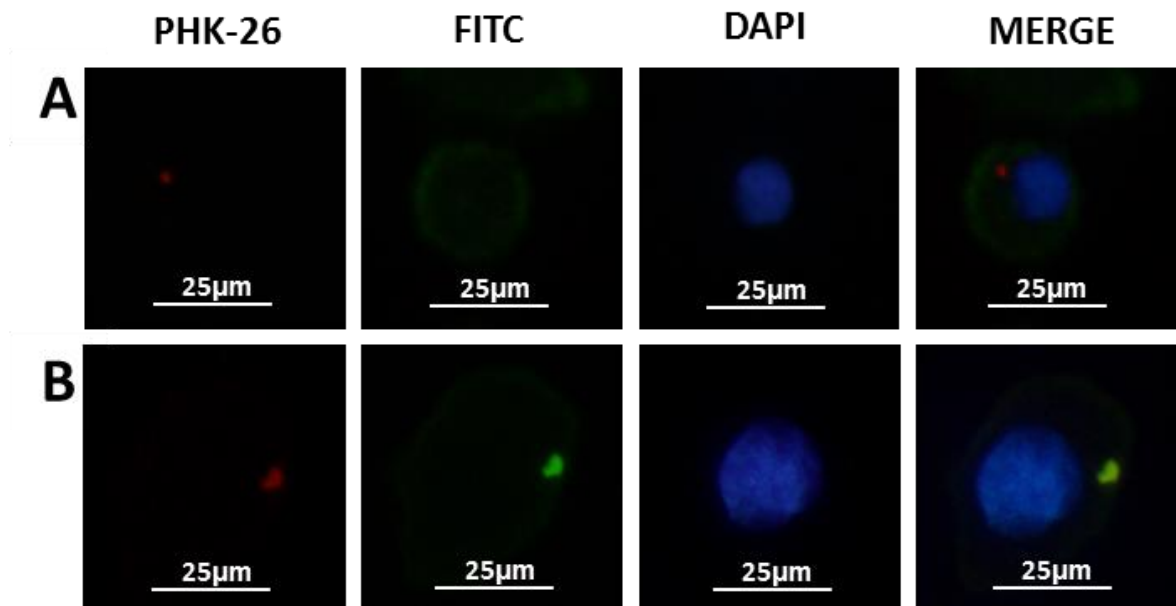
**Figure 4.** Hypothesis of cell communication between injured hepatocytes and BM-MSCs by EVs. Hepatocytes would release EVs containing different kind of molecules, such as proteins, RNAs, and microRNAs that would be captured by BM-MSCs and lead to differentiation into hepatocyte-like cells. When labeled by PKH-26, some of the EVs could be detected in the cultured medium or into the cells if BM-MSCs uptook them.



**Figure 5.** Membrane of injured hepatocytes was labeled with PKH26 to investigate EVs transfer. (A) Injured CCl<sub>4</sub> hepatocytes photographed by inverted microscope revealed red fluorescence. DAPI was used to nuclear counterstaining (Magnification 400X). (B) Hepatocytes analyzed by flow cytometry were positive for PKH26. (C) EVs collected from supernatant 6 and 24 hours after seeding also revealed positively membrane marked vesicles indicating that hepatocyte are the release source of EVs. Arrow indicate beads used as size markers size to determine the gating parameters.



**Figure 6.** Evidence of EVs transfer and uptake by BM-MSCs by flow cytometry. EVs obtained from the lower chamber at 6 hours (A) and 24 hours (B) showing the percentage labeled for PKH-26. No positive EVs were found at the upper chamber (C and D). Absence of positive BM-MSCs at these time points (E and F) suggest that lack of EVs in the upper chamber is not due to BM-MSCs uptake. Experiment carried out with conditioned medium demonstrated that BM-MSCs are capable of uptaking hepatocyte-derived EVs and turn positive to PKH-26 (G and H).



**Figure 7.** Immunofluorescence photograph revealed red points in BM-MSCs (A) and in some of them, this point were coincident with ALB-FITC staining (B), suggesting that hepatocyte-derived EVs could be uptaken by BM-MSCs and that some of them carry albumin.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos e apresentados no presente estudo permitiram avaliar a hipótese surgida nos trabalhos prévios do grupo. O experimento de co-cultivo foi executado com uma população de CTMs em uma passagem adiantada e homogênea, de acordo com os objetivos propostos. Porém não foi possível responder completamente à questão de se as CTMs tem de fato capacidade de diferenciação quando em co-cultivo com hepatócitos lesados.

Os resultados encontrados nos levam a pensar que é possível que a falta de diferenciação possa ser devida ao sistema de co-cultivo não ser adequado para permitir a passagem das VEs. Não pudemos determinar a razão pela qual as VEs de hepatócitos não terem sido detectadas na câmara superior do sistema. Isto foi um achado intrigante que merece ser estudado com maior aprofundamento, porém algumas hipóteses podem ser levantadas.

Uma possível causa é o simples bloqueio físico da camada de células aderidas. Para nós é difícil acreditar em que as células estão de fato bloqueando absolutamente todos os poros, mas como discutido no artigo, é provável que as células diminuam o tamanho do poro e que as vesículas que conseguem atingir a câmara superior sejam menores do que o limite de vesículas que podem ser isoladas pelo método de ultracentrifugação utilizado. Ainda assim, é curioso que se a população de vesículas é de menor tamanho ainda assim não tenha sido detectada a marcação na membrana das CTMs, o que sugere que no co-cultivo as CTMs não capturam as vesículas. Porém, os experimentos com meio condicionado indicam que as CTMs são capazes de captar as VEs. Talvez reduzir a quantidade de células semeadas sobre o inserto, garantindo a

presença de poros livres entre as células, poderia demonstrar se o impedimento físico é realmente o problema.

Por outro lado já é de conhecimento na literatura científica que as CTMs têm uma ação vantajosa no ambiente de lesão e que essa ação é refletida em grande parte pelas vesículas que liberam (ARSLAN *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2010). Isto poderia ser uma segunda resposta à questão de não se ter achado EVs marcadas. Como no presente trabalho não foi avaliado o tráfego de vesículas das CTMs, não podemos saber se a quantidade de vesículas liberadas por elas foi o suficiente para mascarar a presença das vesículas marcadas. Nesta segunda hipótese, as CTMs estariam atuando fortemente na liberação de EVs, em sentido contrário ao foco da nossa análise, que foi a captação de EVs. Conduzir um experimento onde a marcação seja feita em ambos os tipos celulares seria importante para conhecer a real comunicação entre hepatócitos e CTMs envolvidos no sistema.

Em relação aos experimentos com meio condicionado, poderiam ser testados tempos maiores de cultivo e avaliar se ao longo do tempo a marcação positiva nas CTMs aumenta e se isto se reflete em uma mudança do fenótipo celular. Também seria importante avaliar em longo prazo se a exposição ao meio condicionado não atinge níveis de regulação que sejam vistos apenas após um tempo maior.

Finalmente, mudanças de tipo epigenéticas não foram avaliadas no presente estudo. Um nível importante de regulação da expressão gênica é a própria transcrição. Para a transcrição ocorrer é necessário que a sequência regulatória do gene esteja acessível a fatores de transcrição específicos. Sabe-se que existem conformações mais ou menos permissivas na cromatina, as que dependem de modificações reversíveis na molécula de DNA e nas suas proteínas associadas (SNYKERS *et al.*, 2009). É provável

que mudanças epigenéticas também estejam envolvidas no surgimento de células-tipo hepatócitos e sejam particularmente importantes na manutenção deste estado diferenciado. Estudos neste sentido abrem toda uma nova linha de investigação no tema.



## 9 ANEXOS

Produção bibliográfica durante a vigência do mestrado:

- Angiolini VA, Cruz CU, López ML, Simon L, Matte U. Alginate-embedded HuH-7 cells increase MMP-9 and reduce OCLN expression in vitro. *Cancer Cell International*. 2017;17:5. doi:10.1186/s12935-016-0370-x.

Angiolini et al. *Cancer Cell Int* (2017) 17:5  
DOI 10.1186/s12935-016-0370-x

Cancer Cell International

PRIMARY RESEARCH

Open Access



# Alginate-embedded HuH-7 cells increase MMP-9 and reduce OCLN expression in vitro

Virginia Andrea Angiolini<sup>1,2</sup>, Carolina Uribe Cruz<sup>1</sup>, Mónica Luján López<sup>1,3</sup>, Laura Simon<sup>1</sup> and Ursula Matte<sup>1,2,3\*</sup>

- Angiolini, V. A.. Aprendendo a aprender: combatendo a procrastinação com a técnica *pomodoro*. Por que não trazer novas ferramentas à sala de aula..? In: Carmen Lucia Bezerra Machado; Laís Rodrigues Gerzson; Lisete Griebeler Souza; Waldomiro Carlos Manfroi. (Org.). *Educação e Saúde: um aprender a aprender*. 1ed. Porto Alegre/RS: wwlivros, 2016, v. , p. 149-160.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E24 Educação e saúde: um aprender a aprender / organizado por Waldomiro Carlos Manfroi ... [et al.] - Porto Alegre: wwlivros, 2016. 161 p. ; 15,5 X 22,5cm.

ISBN: 978-85-68175-40-8

1. Saúde 2. Educação em saúde I. Manfroi, Waldomiro Carlos. II. Machado, Carmen Lucia Bezerra III. Rodrigues, Laís Gerzson IV. Souza, Lisete Griebeler

CDD 614 : 370