



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Simone Nunes de Carvalho

**Análise da expressão de laminina durante o transplante de células  
mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados**

Rio de Janeiro

2008

Simone Nunes de Carvalho

**Análise da expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Laís de Carvalho

Rio de Janeiro

2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C331 Carvalho, Simone Nunes de.  
Análise da expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados / Simone Nunes de Carvalho. - 2008.  
80 f.

Orientadora: Laís de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Medula óssea - Teses. 2. Regeneração hepática. 3. Matriz extracelular - Teses. 4. Hepatetomia. I. Carvalho, Laís de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.71-018.46

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Simone Nunes de Carvalho

**Análise da expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de janeiro de 2008.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Laís de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Neide Lemos de Azevedo  
Fundação Técnico Educacional Souza Marques - FTESM

Rio de Janeiro

2008

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José e Christina, por serem o maior presente e a mais forte presença de Deus na minha vida. Obrigada por sempre prezarem pelo melhor para mim com total desprendimento.

Ao Roberto, pelo amor e carinho, pela compreensão e paciência, e por me ajudar a seguir em frente com a sua dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Pai zeloso, que me acompanha e dá forças.

A Prof<sup>a</sup> Dra. Laís de Carvalho, pelo carinho e amizade, por toda sua dedicação e comprometimento com a minha formação científica, e por me transmitir o seu conhecimento e experiência. O maior professor é aquele que transforma o seu aluno, que torna um estudante em uma pessoa integrada à sua carreira. Obrigada por assumir com toda responsabilidade essa tarefa tão difícil e importante!

Ao meu tio, Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, pelo apoio e pela amizade, e por poder contar sempre com seu incentivo, conhecimento e experiência.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, professor titular do Departamento de Anatomia e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental do IBRAG, UERJ, pela revisão desse trabalho, pelo apoio e atenção.

Ao Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes S. Porto, titular do Departamento de Histologia e Embriologia, pela colaboração importante nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado, do Departamento de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz, por ceder-nos a utilização do microscópio confocal, imprescindível para a realização desse trabalho, e pelas sugestões importantes.

A Dra. Ana Carolina Stumbo Machado, professora visitante do Departamento de Histologia e Embriologia, pela disponibilidade e ajuda constante, indispensáveis para este trabalho, pelos conselhos e pelo carinho e paciência com que compartilha seu conhecimento desde o meu primeiro dia no laboratório.

A Dra. Erika Afonso Costa Cortez, recém-doutora do Departamento de Histologia e Embriologia, pela amizade e pelo carinho, pela disponibilidade em ajudar com atenção e cuidado, por sempre ter palavras de incentivo e uma postura positiva diante dos problemas. Obrigada pela sua dedicação.

A Prof<sup>a</sup> Alessandra Alves Thole, do Departamento de Histologia e Embriologia, pela participação fundamental nesse trabalho, por me ajudar nos experimentos e por sempre fornecer uma idéia ou sugestão importante. Obrigada pelos momentos de descontração com a sua simpatia contagiante.

As biólogas Manoela Lopes Carvalho e Mariana de Freitas Oliveira e a aluna de iniciação científica Juliana Cristina Tobar da Silva, pela importante ajuda nos experimentos, pela competência e amizade e por tornar os dias de trabalho mais leves e animados.

Ao médico veterinário Carlos Eduardo Rodrigues Caetano, sempre disponível na realização das inúmeras cirurgias de hepatectomia e dos minuciosos transplantes de células de medula óssea. Obrigada por tornar este trabalho possível.

Ao técnico da plataforma de microscopia confocal do IOC Bernardo M. Pascarelli, pela atenção e paciência em nos ajudar com as imagens obtidas.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia Ana Lúcia Rosa Nascimento, Josefa da Silva Alves, Angélica Alves Figueiredo, Alan César Nunes de Moraes e Kátia Lima, pela simpatia e pelo auxílio constante durante a realização desse trabalho.

Ao técnico Mauro Luiz dos Santos (*in memoriam*), do Departamento de Histologia e Embriologia, que foi o responsável pela manutenção dos animais utilizados nesse trabalho, pela simpatia e pelas inúmeras vezes em que me ajudou.

A todos do Departamento de Histologia e Embriologia, por me receberem com carinho e por proporcionarem um ambiente agradável.

Aos meus amigos e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

CARVALHO, Simone Nunes de. *Análise da expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea em ratos hepatectomizados*. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A medula óssea adulta possui duas populações de células-tronco importantes no tratamento de diversas doenças hepáticas: células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e células-tronco mesenquimais. A regeneração do fígado após a hepatectomia é um processo complexo que requer a proliferação de todas as células hepáticas. Fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular são elementos-chave nesse processo. As lamininas são uma família de proteínas de matriz extracelular, com funções adesivas e quimiotáticas pelo recrutamento de integrinas e outros receptores de superfície celular. No fígado normal, a laminina é expressa nas veias porta e centrolobular. O objetivo desse estudo foi investigar a expressão de laminina durante a regeneração hepática induzida por hepatectomia parcial e após o transplante de células mononucleares de medula óssea. As células mononucleares de medula óssea foram obtidas dos fêmures e tíbias de ratos, isoladas, marcadas com DAPI e injetadas pela veia porta em ratos recém-hepatectomizados. Os fígados foram coletados 15 minutos, 1 dia e 3 dias após a hepatectomia e o transplante de células de medula óssea e congelados. Os cortes foram imunomarcados com anticorpos primários anti-CD34 e anti-laminina de rato e observados em microscópio confocal de varredura a laser. Os resultados mostraram que 15 minutos após a hepatectomia parcial, as células-tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> transplantadas foram encontradas em contato com a laminina localizada nas veias porta e centrolobular, indicando que a laminina poderia participar na adesão inicial das células-tronco a esses vasos logo após o seu transplante. Além disso, 1 e 3 dias após a hepatectomia, as células mononucleares de medula óssea transplantadas foram observadas nos sinusóides hepáticos expressando laminina. Esses resultados sugerem que a laminina pode ser um componente da matriz extracelular importante para a adesão e enxerto de células de medula óssea no fígado após uma lesão. Nós também analisamos a expressão de osteopontina (OPN) em células de medula óssea e CTHs. Os resultados por microscopia confocal demonstraram que a maioria das células mononucleares de medula óssea recém-isoladas expressa quantidades variáveis de OPN. Além disso, algumas CTHs CD34<sup>+</sup> também expressam OPN. Após 1 e 4 dias de cultura, observamos uma diminuição de células expressando CD34, e um aumento na expressão de OPN pelas células mononucleares de medula óssea.

Palavras-chave: Hepatectomia parcial. Regeneração hepática. Células mononucleares de medula óssea. Laminina. Osteopontina.

## ABSTRACT

The adult bone marrow retains two populations of stem cells with emerging importance for the treatment of diverse liver diseases: hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells. Liver regeneration after partial hepatectomy is a complex process that requires the proliferation of all hepatic cells. Growth factors, cytokines and extracellular matrix molecules are key elements in this process. Laminins are a family of heterotrimeric extracellular matrix proteins with adhesive and chemotactic functions, through recruitment of integrins and other cell surface receptors. In the normal liver, laminin is expressed in portal and centrolobular veins. The aim of this study was to investigate laminin expression during liver regeneration induced by partial hepatectomy and after bone marrow mononuclear cells transplantation. Rat bone marrow mononuclear cells were obtained from tibias and femurs, isolated, stained with DAPI and injected in immediately hepatectomized rats via portal vein. Livers were collected 15 minutes, 1 day and 3 days after hepatectomy and bone marrow cells transplantation and frozen. Liver sections were immunolabeled with mouse anti-rat CD34 and rabbit anti-rat laminin primary antibodies and observed under a Laser Scanning Confocal Microscope. Results showed that 15 minutes after partial hepatectomy, transplanted CD34<sup>+</sup> HSCs were found in contact with laminin, which was localized principally in portal and centrolobular veins of rat livers, indicating that laminin could participate in stem cell initial attachment to these vessels soon after their transplantation. Furthermore, 1 and 3 days after hepatectomy, transplanted bone marrow mononuclear cells were found in the hepatic sinusoids expressing laminin. These results suggest that laminin could be an important extracellular matrix component for bone marrow cell adhesion and grafting in the injured liver. We also analyzed osteopontin (OPN) expression in bone marrow mononuclear cells and HSCs. Results by confocal microscopy showed that the most freshly isolated bone marrow mononuclear cells express variable amounts of OPN. Furthermore, some CD34<sup>+</sup> HSCs also expressed OPN. After 1 and 4 days in culture, we observed a decrease in CD34<sup>+</sup> cells, and an increase in OPN expression in bone marrow mononuclear cells.

Keywords: Partial hepatectomy. Hepatic regeneration. Bone marrow mononuclear cells. Laminin. Osteopontin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	Representação esquemática do fígado.....	17
Esquema 2	Detalhe mostrando células do parênquima hepático.....	18
Esquema 3	Estrutura das diferentes isoformas de laminina.....	24
Esquema 4	Representação esquemática do desenvolvimento hematopoiético.....	28
Esquema 5	Hierarquia do sistema hematopoiético.....	28
Esquema 6	Expressão de marcadores de células-tronco hematopoiéticas primitivas e seus progenitores.....	30
Esquema 7	Representação da célula-tronco hematopoiética na medula óssea....	32
Esquema 8	Representação esquemática da estrutura da osteopontina.....	33
Esquema 9	Hipóteses da participação das CTHs na regeneração hepática.....	35
Esquema 10	Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos.....	40
Figura 1	Microscopia confocal – 15 min de hepatectomia.....	45
Figura 2	Microscopia confocal – 15 min de hepatectomia.....	46
Figura 3	Microscopia confocal – 15 min de hepatectomia.....	47
Figura 4	Microscopia confocal – 1 dia de hepatectomia.....	48
Figura 5	Microscopia confocal – 1 dia de hepatectomia.....	49
Figura 6	Microscopia confocal – 1 dia de hepatectomia.....	50
Figura 7	Microscopia confocal – 3 dias de hepatectomia.....	51
Figura 8	Microscopia confocal – 3 dias de hepatectomia.....	52
Figura 9	Microscopia confocal – controle negativo - 3 dias de hepatectomia...	53
Figura 10	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 15 min.....	54
Figura 11	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 1 dia.....	55
Figura 12	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 1 dia.....	56
Figura 13	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 1 dia.....	57
Figura 14	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	58
Figura 15	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	59

Figura 16	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	60
Figura 17	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	61
Figura 18	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	62
Figura 19	Microscopia confocal – hepatectomia e transplante de CMMO – 3 dias.....	63
Figura 20	Microscopia confocal – CMMO imunomarcadas com CD34 e OPN....	65
Figura 21	Citometria de Fluxo de CMMO para análise de expressão de OPN...	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AAF: 2-acetil-aminofluoreno

CFU-F: unidades formadoras de colônia de fibroblastos

C-kit: tyrosine kinase receptor (receptor tirosino-quinase)

CTH / CTHs: célula-tronco hematopoiética / células-tronco hematopoiéticas

CTM / CTMs: célula-tronco mesenquimal / células-tronco mesenquimais

Cy-3: cyanine dye 3

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

EGF: fator de crescimento do epitélio

FGF: fator de crescimento do fibroblasto

FITC: fluorescein isothiocyanate

GM-CSF: granulocyte/macrophage stimulating factor (fator estimulador de granulócito/macrófago)

HGF: fator de crescimento do hepatócito

HSCs: hematopoietic stem cells

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

LIF: fator inibidor de leucemia

MEC: matriz extracelular

MMP-9: metaloproteinase 9

MMPs: metaloproteinases

NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa B

OPN: osteopontina

PBS: phosphate buffer saline (tampão fosfato salino)

RE: retículo endoplasmático

RGD: sequência de aminoácidos arginina-glicina-aspartato

RPM: rotações por minuto

Sca-1: stem cell antigen-1 (antígeno de célula-tronco 1)

SCF: stem cell factor (fator de célula-tronco)

SDF-1: stromal cell derived factor-1 (fator derivado da célula estromal 1)

TGF-  $\alpha$ : fator de crescimento transformante alfa

Thy-1: antígeno de timócitos-1

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TRITC: tetramethylrhodamine isothiocyanate

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1 HISTOLOGIA DO FÍGADO.....	15
2 HEPATECTOMIA E REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	19
3 MATRIZ EXTRACELULAR: REMODELAMENTO DURANTE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	21
3.1 Colágeno.....	21
3.2 Fibronectina.....	22
3.3 Laminina.....	22
4 CÉLULAS-TRONCO.....	25
4.1 Células-tronco intra-hepáticas.....	25
4.2 Células-tronco hematopoiéticas de medula óssea.....	26
4.3 Células-tronco mesenquimais de medula óssea.....	30
4.4 Medula óssea e o nicho hematopoiético.....	31
5 CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA E REGENERAÇÃO HEPÁTICA.....	34
5.1 Células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e regeneração hepática.....	34
5.2 Células-tronco mesenquimais (CTMs) e regeneração hepática.....	35
5.3 Mobilização de células da medula óssea para o fígado lesionado.....	36
6 JUSTIFICATIVA.....	37
7 OBJETIVOS.....	38
8 METODOLOGIA.....	39
8.1 Isolamento de células mononucleares da medula óssea de ratos.....	39
8.2 Hepatectomia de 70% e transplante de células mononucleares da medula óssea.....	41
8.3 Grupos experimentais.....	41
8.4 Processamento de tecido hepático para microscopia de fluorescência.....	41
8.5 Análise da expressão de osteopontina (OPN) em células de medula óssea e células-tronco hematopoiéticas (CTHs) .....	42
8.6 Citometria de Fluxo para OPN de células mononucleares da medula óssea.....	43
9 RESULTADOS.....	44
9.1 Expressão de laminina após hepatectomia de 70%.....	44
9.2 Expressão de laminina após hepatectomia de 70% e transplante de células de medula óssea.....	44

9.3	<b>Análise da expressão de osteopontina (OPN) em células de medula óssea e células-tronco hematopoiéticas (CTHs).....</b>	64
9.4	<b>Citometria de Fluxo para OPN de células mononucleares da medula óssea.....</b>	64
10	<b>DISCUSSÃO.....</b>	67
11	<b>CONCLUSÃO.....</b>	69
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	70
	<b>APÊNDICE – Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats.....</b>	75

## INTRODUÇÃO

### 1 HISTOLOGIA DO FÍGADO

O fígado é um órgão associado ao tubo digestivo, situado à direita na cavidade abdominal e abaixo do diafragma. Nesse órgão, os nutrientes absorvidos no tubo digestivo são processados e armazenados, para posteriormente serem transportados pela circulação sanguínea e utilizados por outros órgãos, constituindo, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. A maior parte do sangue chega ao fígado pela veia porta (cerca de 70%), contendo os nutrientes absorvidos no tubo digestivo. A veia porta também traz o sangue proveniente do pâncreas e do baço. O restante é suprido pela artéria hepática, que traz o sangue oxigenado pelos pulmões (esquema 1). Além disso, os lipídios complexos (ou quilomícrons) são nutrientes que, após serem absorvidos pelo sistema digestivo, chegam ao fígado através dos vasos linfáticos. Assim, o fígado ocupa uma posição estratégica no sistema circulatório, ideal para captar, transformar e armazenar metabólitos e para neutralizar e eliminar substâncias tóxicas produzidas ou absorvidas pelo organismo. Essa eliminação ocorre na bile, uma secreção exócrina do fígado, importante também para a digestão de lipídeos. Outra função essencial do fígado é a síntese de proteínas plasmáticas, importantes para a homeostase sanguínea, como a albumina e outras proteínas carreadoras (Kmiec 2001, Junqueira e Carneiro 2004, Malarkey *et al.* 2005).

O fígado é revestido externamente por uma camada delgada de tecido conjuntivo (cápsula de Glisson). Esse tecido conjuntivo se torna mais espesso no hilo hepático, que é por onde penetram a veia porta e a artéria hepática e por onde saem os ductos hepáticos e linfáticos. O tecido conjuntivo reveste esses vasos e ductos até o final de sua extensão, em estruturas denominadas espaços porta (esquema 1), onde é formada uma rede delgada de fibras reticulares, composta principalmente de colágeno tipo I e III, que sustenta os hepatócitos (principal célula do fígado) e as células endoteliais dos capilares sinusóides (Kmiec 2001, Junqueira e Carneiro 2004, Malarkey *et al.* 2005).

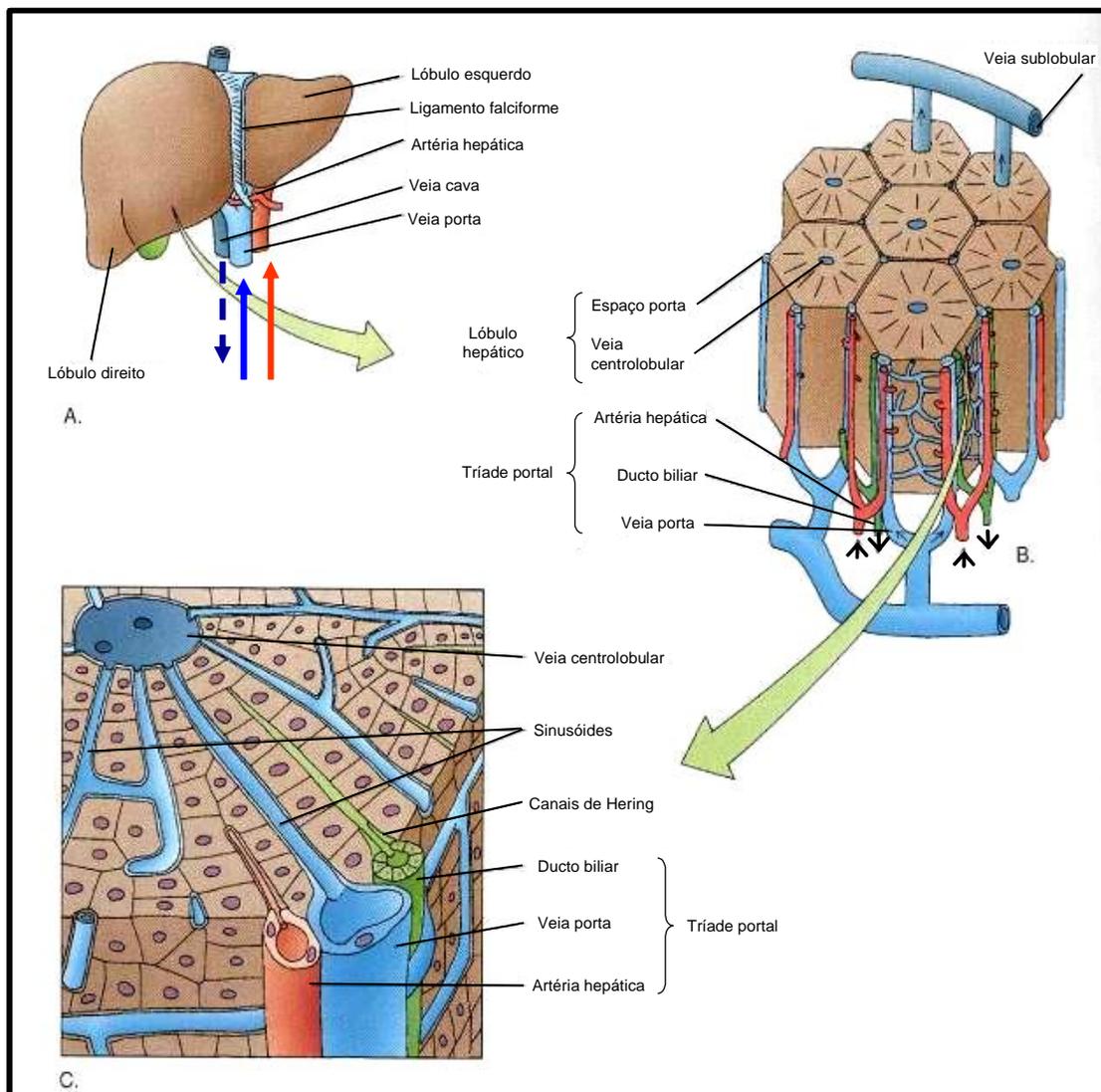
Os hepatócitos (do grego *hepar*, fígado, + *kytos*, célula), componentes estruturais básicos do fígado, são células epiteliais agrupadas em placas

interconectadas nos lóbulos hepáticos, muito evidentes no fígado de suínos, onde esses lóbulos estão separados por uma camada espessa de tecido conjuntivo, e menos evidente em humanos, camundongos e ratos (esquema 1). O hepatócito é uma célula altamente versátil e de metabolismo intenso, com muitas mitocôndrias e retículo endoplasmático (RE) liso e rugoso bem desenvolvido. Os espaços porta estão presentes nas periferias dos lóbulos, e são constituídos de um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto do sistema de ductos biliares, vasos linfáticos e nervos. Os ductos biliares são constituídos de epitélio cubóide e transportam a bile, sintetizada pelos hepatócitos, em direção ao ducto hepático para ser armazenada na vesícula biliar (esquema a 1). Os vasos linfáticos transportam a linfa, que eventualmente entra na circulação sanguínea (Wake 1999, Kmiec 2001, Junqueira e Carneiro 2004, Malarkey *et al.* 2005).

No lóbulo hepático, os hepatócitos formam placas que se anastomosam, e se arranjam radialmente, em direção ao centro do lóbulo hepático, onde está a veia central ou veia centrolobular. O sangue chega ao fígado pela veia porta e artéria hepática, onde é mais oxigenado e rico em nutrientes, passa pelos capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos e sai do fígado pela veia centrolobular, com baixa concentração de oxigênio e contendo metabólitos para excreção. Essa diferença regional do fígado influencia o metabolismo das células hepáticas e por isso, a capacidade de regeneração no espaço porta é maior do que próximo à veia centrolobular. Os capilares sinusóides são revestidos por células endoteliais fenestradas, formando uma camada descontínua (esquema 2). Essas células endoteliais estão separadas dos hepatócitos adjacentes por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial (espaço de Disse), que contém microvilos dos hepatócitos (esquema 2). Assim, fluidos do sangue atravessam a parede endotelial e entram em contato com os microvilos dos hepatócitos, facilitando a troca de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos e vice-versa (Martinez-Hernandez e Amenta 1993, Wake 1999, Kmiec 2001, Malarkey *et al.* 2005).

Na superfície luminal das células endoteliais dos sinusóides estão as células de Kupffer, que são macrófagos do fígado com funções específicas, como metabolizar eritrócitos velhos e digerir a sua hemoglobina, participar dos processos imunológicos e fagocitar e destruir bactérias que eventualmente chegam pelo sangue portal a partir do intestino grosso, daí a presença de muitas células de

Kupffer próximas aos espaços porta (Junqueira e Carneiro 2004, Malarkey *et al.* 2005).

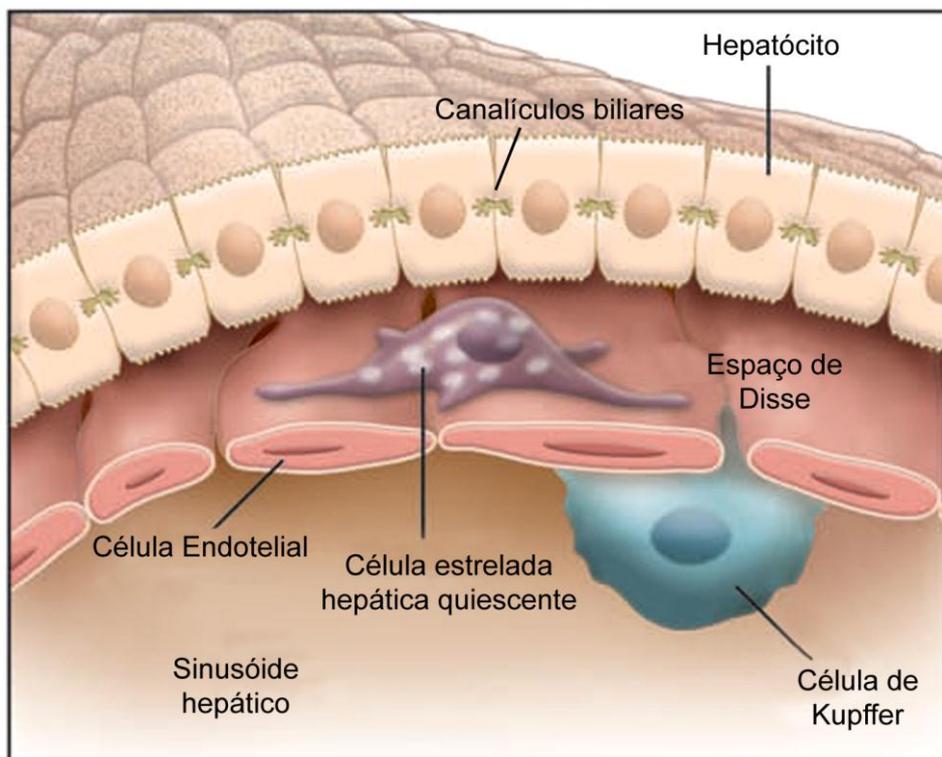


Esquema 1: Representação esquemática do fígado. Em (A), a anatomia do fígado mostrando os lobos hepáticos e os principais vasos. (B) lóbulos hepáticos mostrando os espaços porta e a veia centrolobular. (C) Porção do lóbulo hepático, mostrando o espaço porta (triáde portal), placas de hepatócitos, os capilares sinusóides, o canalículo biliar e a veia centrolobular (Fonte: Gartner e Hiatt 2007).

No espaço de Disse estão as células estreladas hepáticas (células de Ito), que no fígado normal armazenam lipídios e vitamina A, sintetizam fatores de crescimento e citocinas, produzem ou degradam componentes da matriz extracelular, além de regularem o diâmetro do lúmen dos sinusóides, e, portanto a circulação sanguínea hepática. Entretanto, após uma lesão crônica (como consumo de etanol e toxinas), sob estímulo inflamatório as células estreladas hepáticas se tornam ativadas e proliferam, adquirindo características de miofibroblastos, como a expressão de alfa-actina de músculo liso. Nessas condições, esses miofibroblastos

secretam matriz extracelular em excesso e degradam-na ineficientemente, acarretando no desenvolvimento da fibrose. Posteriormente, o excesso de colágeno acumulado nos espaços de Disse e entre os lóbulos hepáticos prejudica o contato entre os hepatócitos e os sinusóides hepáticos, acarretando na morte dos hepatócitos e num processo inflamatório onde pode ocorrer necrose. Nesse estágio se desenvolve uma complicação da fibrose hepática, denominada cirrose (Martinez-Hernandez e Amenta 1995, Fausto 2000, Malarkey *et al.* 2005, Iredale 2007).

Nas regiões de contato entre as membranas celulares de dois hepatócitos existem junções oclusivas e junções comunicantes do tipo *gap*, e ocorre a delimitação de um espaço tubular com pequenos microvilos no seu interior, denominado canalículo biliar, que é a primeira porção do sistema de ductos biliares (esquema 2). Esses canalículos biliares formam uma rede complexa entre os hepatócitos, e se anastomosam ao longo das placas do lóbulo hepático, terminando no ducto biliar dos espaços porta. Portanto, a bile flui do centro para a periferia do lóbulo hepático, onde adentra os dúctulos biliares, também chamados Canais de Hering, que são os menores ramos dos ductos biliares do espaço porta (Junqueira e Carneiro 2004, Malarkey *et al.* 2005).



Esquema 2: Detalhe mostrando células do parênquima hepático. Os pontos de junção entre dois hepatócitos apresentam os canalículos biliares, que transportam a bile. Os cordões de hepatócitos estão separados das células endoteliais dos capilares sinusóides hepáticos pelo espaço de Disse, onde a matriz extracelular é secretada principalmente pelas células estreladas hepáticas. As células de Kupffer são macrófagos que residem na luz dos capilares sinusóides. Adaptado de Iredale (2007).

## 2 HEPATECTOMIA E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

A perda precipitada de parênquima hepático geralmente resulta de uma injúria aguda de origem viral ou química, tendo conseqüências prejudiciais que levam a incapacidade do fígado em manter suas funções metabólicas essenciais. Nos últimos anos, grandes avanços permitiram elucidar a dinâmica de citocinas e fatores de crescimento, seus receptores e moléculas sinalizadoras intracelulares durante o desenvolvimento e a regeneração do fígado (Bilir *et al.* 2000, Iredale 2007).

A falência hepática aguda é uma doença progressiva, com efeitos devastadores e rápida perda da função hepática, pelo comprometimento do parênquima e vasos. O tratamento atual é o transplante de fígado, que pode apresentar complicações e acarretar um grande tempo na fila de espera por doadores compatíveis, onde apenas cerca de 40% dos pacientes conseguem um doador (Bilir *et al.* 2000, Iredale 2007). O transplante de hepatócitos é uma alternativa indicada principalmente para defeitos congênitos do metabolismo hepático (Najimi e Sokal 2005).

A hepatectomia parcial foi primeiramente descrita em 1931 por Higgins e Anderson, e envolve a remoção cirúrgica de lobos específicos correspondendo a aproximadamente dois terços ou 70% da massa do fígado. Os lobos restantes então crescem para compensar a perda de massa hepática, entretanto os lobos retirados não voltam a crescer (Ogura *et al.* 2001). A regeneração hepática após hepatectomia parcial é um fenômeno muito complexo e bem-orquestrado, realizado com a participação de diversos tipos celulares hepáticos. Os hepatócitos, por exemplo, dividem-se uma ou até duas vezes em um processo que dura de 24h a 48h, e o restante das células hepáticas por 5 dias, quando retornam à quiescência. Esse processo é associado com cascatas de sinalização envolvendo fatores de crescimento, citocinas, remodelamento de matriz extracelular e vários mecanismos de feedback de sinais estimulatórios e inibitórios relacionados ao crescimento. Assim, o fígado é capaz de restaurar perdas de sua massa e de se ajustar ao volume inicial do órgão, fornecendo ao mesmo tempo suporte para a homeostase corporal durante todo esse processo regenerativo (Michalopoulos 2007).

Após a hepatectomia ocorre um déficit na capacidade metabólica, induzindo uma resposta celular e molecular imediata com a liberação das citocinas TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6) e dos fatores de crescimento

como HGF (fator de crescimento do hepatócito), TGF- $\alpha$  (fator de crescimento transformante alfa) e EGF (fator de crescimento do epitélio). Há duas etapas descritas no processo de regeneração. A primeira etapa envolve a transição dos hepatócitos da fase G0 para a fase G1 do ciclo celular, mediada por TNF- $\alpha$  e IL-6, que ativam os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e STAT3, respectivamente. O nível de expressão desses fatores determinará o destino do órgão lesionado, pois são fatores de sobrevivência que previnem a apoptose, além de ativarem cascatas de sinalização que levam a proliferação celular. Na segunda etapa do processo de regeneração, ocorre a progressão das células passando do ponto de restrição em G1, se preparando para a mitose, mediada pelos fatores de crescimento HGF, TGF- $\alpha$  e EGF. Além disso, são ativadas cascatas de sinalização e ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e ocorrem mudanças na expressão de genes (Fausto *et al.* 2006, Hortelano *et al.* 2007). Acredita-se que essas citocinas e fatores possam ser usados futuramente como agentes terapêuticos para acentuar a capacidade natural de regeneração do fígado sob injúria, com o objetivo de promover a proliferação no processo regenerativo (Fausto *et al.* 2006).

### 3 MATRIZ EXTRACELULAR: REMODELAMENTO DURANTE A REGENERAÇÃO HEPÁTICA

No fígado, a matriz extracelular (MEC) é composta de diversas macromoléculas como fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina e proteoglicanas, funcionando como um suporte físico para células epiteliais e endoteliais. Além disso, modula a diferenciação, migração, crescimento celular e apoptose. No fígado, a MEC é encontrada no espaço de Disse, principalmente composta de colágeno dos tipos I, III e VI, fibronectina, laminina, entactina e perlecana. A proteína mais abundante da MEC do fígado é a fibronectina, que pode estar solúvel no plasma ou insolúvel na MEC e ambas as formas são produzidas por hepatócitos, sendo secretadas em grandes quantidades em processos de regeneração hepática (Martinez-Hernandez e Amenta 1995, Kumaran *et al.* 2005). Componentes selecionados da MEC sofrem rápida reorganização após lesões hepáticas extensivas que induzem a regeneração, sendo esse um evento chave para a proliferação de hepatócitos durante os estágios iniciais críticos da regeneração hepática (Kumaran, V. *et al.*, 2005).

#### 3.1 Colágeno

O colágeno consiste de uma classe heterogênea de proteínas, que exerce diferentes funções, principalmente estruturais. Atualmente cerca de 20 tipos de colágenos foram caracterizados, exibindo diferentes propriedades mecânicas e funcionais. Colágenos do tipo I, II e III são os mais abundantes em humanos e formam fibras responsáveis pela força de tensão do tecido (Rosso *et al.* 2004, Kar *et al.* 2006).

O colágeno produzido pelos fibroblastos é a principal proteína estrutural da matriz extracelular. Todos os tipos de colágeno contêm três cadeias polipeptídicas alfa, que formam uma molécula helicoidal tripla. Os diferentes tipos de colágeno podem ter cadeias curtas ou longas e formar fibrilas, filamentos ou redes. No espaço de Disse do fígado, há uma camada de tecido conjuntivo próxima aos sinusóides endoteliais, na qual os principais tipos de colágenos presentes são I, III, V e VI,

secretados principalmente pelas células estreladas hepáticas. Esse tecido conjuntivo está em continuidade à matriz extracelular nos septos, espaços porta, lóbulos e veias centrolobulares, funcionando como suporte ao parênquima hepático. O colágeno IV participa da formação das membranas basais na maioria dos tecidos. Entretanto, embora as células endoteliais do fígado normal não formem uma membrana basal, o colágeno IV pode ser encontrado ao redor dos sinusóides em depósitos livres (Martinez-Hernandez e Amenta 1995, Kar *et al.* 2006, Iredale 2007).

Logo após a hepatectomia parcial, ocorre um leve aumento na síntese de colágeno, e diminui a sua degradação. No final da regeneração hepática em ratos (14 dias) os níveis de colágeno são semelhantes aos do fígado normal (Yamamoto *et al.* 1995, Wack *et al.* 2001).

### 3.2 Fibronectina

A fibronectina, uma proteína de matriz extracelular que contém uma seqüência RGD (arginina–glicina–aspartato) de ligação a diversas integrinas, está implicada na migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. A expressão de fibronectina é abundante no espaço de Disse do fígado, e aumenta gradativamente nos 4 dias após a hepatectomia (Wack *et al.* 2001).

### 3.3 Laminina

As lamininas compõem uma família de glicoproteínas heterotriméricas compostas de cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , primariamente localizadas em membranas basais, mas também em alguns compartimentos mesenquimais. As lamininas podem formar redes e filamentos, e ligar-se às integrinas e outros receptores na superfície celular. Essas atividades determinam a adesão, migração e diferenciação celular, a expressão de genes e o destino da célula. Existem, até o momento, cinco cadeias  $\alpha$ , três  $\beta$  e duas  $\gamma$  de lamininas descritas. Todas as cadeias têm uma estrutura em mosaico com vários tipos de módulos (esquema 3). É comum a todas as lamininas um domínio enovelado na região C-terminal. Esse domínio é crucial para a formação do heterotrímero e por isso é uma característica da classificação da laminina. Cada

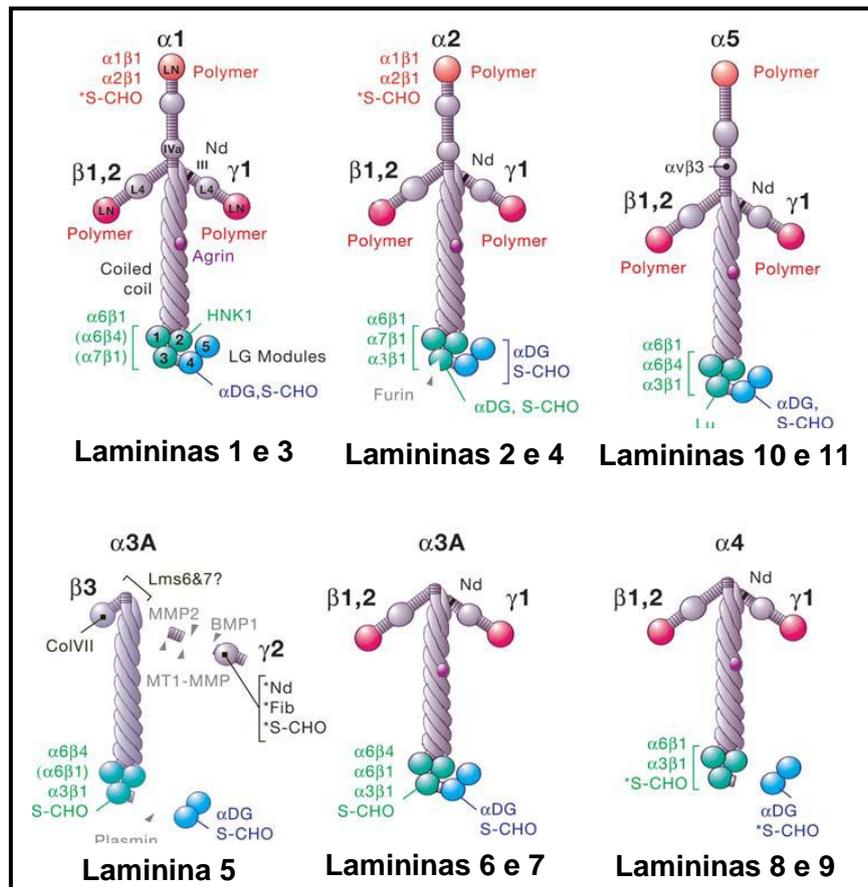
classe de cadeia de laminina também tem suas características únicas, que juntamente com comparações entre seqüências, permite sua classificação (Miner e Yurchenco 2004, LeBleu *et al.* 2007).

A visualização das lamininas por microscopia eletrônica de transmissão mostra geralmente um formato em cruz ou tridente, com um braço longo (80nm) e dois ou três braços curtos (25-40 nm). Durante a formação da laminina ocorrem interações hidrofóbicas e polares entre as três cadeias. Esse processo ocorre todo intracelularmente e é necessário para a secreção e também envolve seleção de cadeias, já que um número limitado de formações heterotriméricas foi observado até hoje para as lamininas. As várias isoformas de laminina têm uma variedade de atividades funcionais e biológicas, que incluem interações de lamininas de maneira homotípica ou entre isoformas diferentes, heterotípica, com muitos outros ligantes extracelulares, e interações celulares entre vários receptores, integrinas ou não. Todas essas interações podem ter fortes efeitos na célula, como forma, regulação gênica e outros. Há evidência crescente de funções específicas para isoformas particulares de laminina, provendo alguns indícios de como essa família de proteínas evoluiu. Isso é em parte refletido por distribuições distintas, mas que freqüentemente se sobrepõem de isoformas de lamininas (Miner e Yurchenco 2004, Sasaki *et al.* 2004).

Já está descrito que ocorrem interações adesivas entre células-tronco hematopoiéticas de medula óssea e isoformas específicas de laminina *in vitro*. Essas interações afetam a migração e podem ter um papel fisiológico durante a hematopoiese na medula óssea (Gu *et al.* 2003, Sagar *et al.* 2006).

No fígado normal, a laminina está presente na parede da veia centrolobular e dos vasos do espaço porta, e está ausente nos capilares sinusóides do fígado normal. Entretanto, após a hepatectomia, ocorre um aumento na expressão de laminina nos vasos do espaço porta e veia centrolobular, e a laminina passa a ser expressa nos capilares sinusóides. Sugere-se que essa expressão de laminina no parênquima pode estar envolvida com a migração de células endoteliais e a formação de novos sinusóides, que penetram nos aglomerados de hepatócitos em proliferação no fígado durante a regeneração. Porém, 4 dias após a hepatectomia, a expressão de laminina começa a diminuir, retornando aos níveis do fígado normal (Wack *et al.* 2001). Estudos mostraram que a laminina  $\alpha$ -1 é a principal cadeia presente nos sinusóides em regeneração após a hepatectomia. Entretanto, as

lamininas  $\gamma$ -1 e  $\alpha$ -5 estão restritas aos vasos do espaço porta e veia centrolobular (Kikkawa *et al.* 2005). Sabe-se que ocorre aumento na expressão de laminina durante diversos tipos de fibrose hepática. Ao contrário da hepatectomia, na fibrose hepática, a expressão de laminina começa a aumentar somente 1 semana após a indução de fibrose e permanece alta mesmo após 1 mês, formando uma estrutura semelhante a membrana basal nos capilares sinusóides (Xia *et al.* 2006).



Esquema 3: Estrutura das diferentes isoformas de laminina, com suas cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  em diferentes conformações (Miner e Yurchenco 2004).

## 4 CÉLULAS-TRONCO

### 4.1 Células-tronco intra-hepáticas

Durante muitos anos acreditou-se que a regeneração hepática ocorria através da divisão de hepatócitos maduros. Entretanto, recentemente foi demonstrada a participação de células-tronco intra-hepáticas, denominadas células ovais, durante a regeneração do fígado em doenças crônicas (Fausto e Campbell 2003, Corcelle *et al.* 2006, Tsamandas *et al.* 2007). As células ovais são células epiteliais que margeiam os ductos biliares (Canais de Hering) e são capazes de proliferar e se diferenciar em hepatócitos e células dos ductos biliares. A proliferação dessas células ovais ocorre logo após a indução de lesão hepática em modelos animais experimentais, e também participam do processo de repovoamento hepático em humanos após necrose aguda e doença hepática crônica (Corcelle *et al.* 2006, Tsamandas *et al.* 2007).

Além disso, células-tronco extra-hepáticas podem migrar da medula óssea para o fígado quando a capacidade regenerativa do órgão está comprometida, sugerindo uma relação entre populações de células-tronco no fígado e células-tronco hematopoiéticas de medula óssea (Lagasse *et al.* 2000, Kotton *et al.* 2005, Oh *et al.* 2007). Ainda não está claro como diferentes populações de células-tronco interagem umas com as outras e com populações de hepatócitos maduros para obter novas células durante a regeneração do fígado (Konig *et al.* 2005, Michalopoulos 2007).

Mais recentemente, mostrou-se que células da medula óssea parecem prover um reservatório de hepatócitos e células ovais. Esse fenômeno foi primeiramente descrito após a observação de que células ovais adultas no fígado expressam marcador de superfície CD34 e thy-1, característicos de células-tronco hematopoiéticas (Corcelle *et al.* 2006, Oh *et al.* 2007).

A administração de um composto que inibe a proliferação de hepatócitos (2-acetil-aminofluoreno - 2-AAF) durante a lesão hepática induz a proliferação de células ovais. Em ratos transplantados com células da medula óssea nesse modelo utilizando 2-AAF, surgem células ovais expressando marcadores genéticos que identificam as células de medula óssea transplantadas, sugerindo a diferenciação de

células-tronco hematopoiéticas em células ovais (Petersen *et al.* 1999, Fausto e Campbell 2003).

Recentemente, foram descritas outras subpopulações de células progenitoras do fígado, como as células progenitoras endoteliais que expressam um marcador de células-tronco, o Sca-1 (stem cell antigen-1), e que participam também da regeneração hepática (Tsuchiya *et al.* 2008).

#### 4.2 Células-tronco Hematopoiéticas de medula óssea

A medula óssea possui duas populações de células-tronco que coexistem de maneira funcionalmente interdependente: as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e as células-tronco mesenquimais do estroma da medula óssea (CTMs). E são essas células que vêm sendo utilizadas em diversas terapias celulares (Mendez-Otero *et al.* 2007).

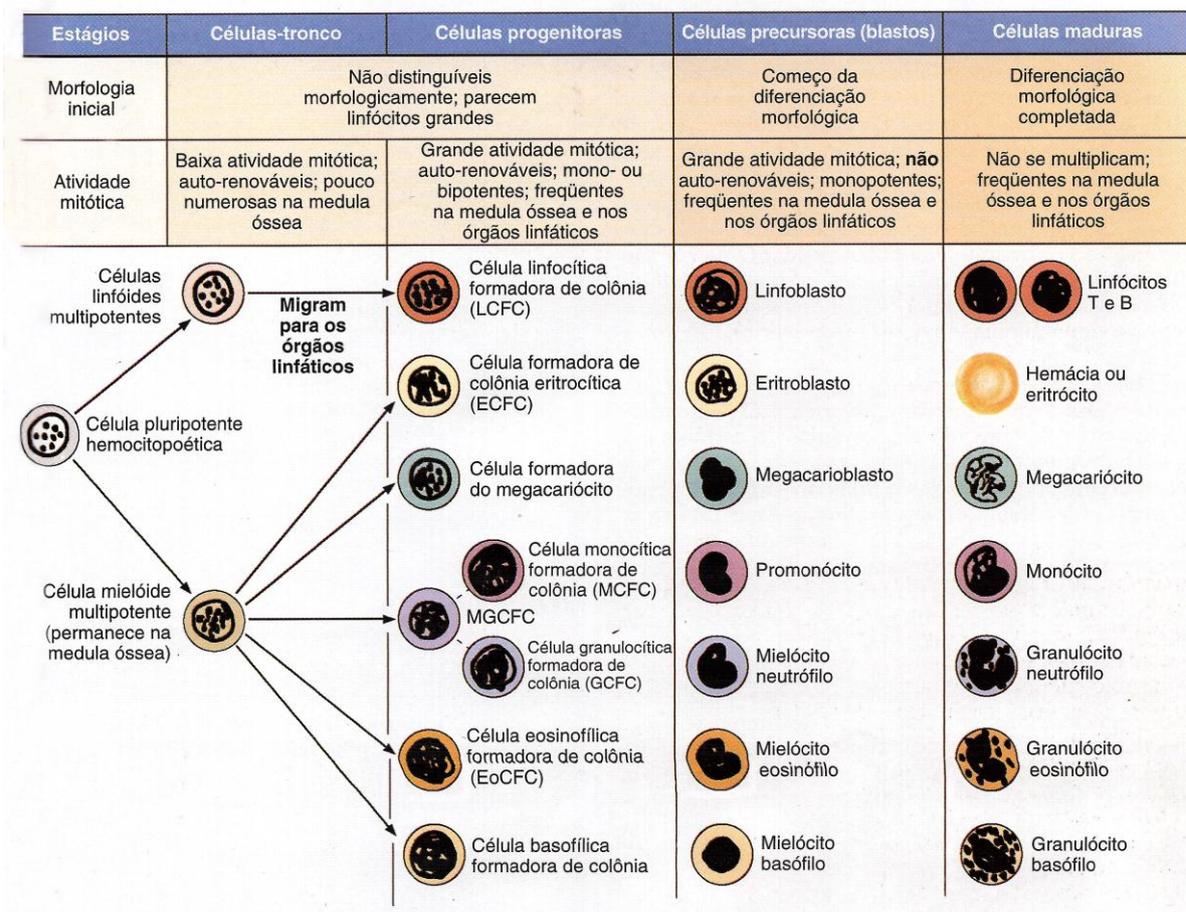
Entre o grande número de células-tronco de adultos atualmente conhecidas, a célula-tronco hematopoiética (CTH) ocupa a honrosa posição de ter sido a primeira descrita, sendo ainda a melhor compreendida e a mais amplamente aplicada em protocolos clínicos. Esta situação é compreensível, se considerarmos a facilidade de acesso ao tecido hematopoiético – sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical – tanto em indivíduos normais quanto nos afetados por doenças como anemias e leucemias. A fácil coleta das células propiciou seu estudo *in vitro* muito precocemente (Nardi e Alfonso 2006).

A CTH pode ser definida funcionalmente pela sua capacidade de regenerar e manter todas as células linfóides e mielóides maduras do tecido sanguíneo, medula óssea, baço e timo. Além disso, a CTH possui três características típicas de células-tronco: (1) são multipotentes, pois geram progenitores de pelo menos oito das principais linhagens hematopoiéticas: linfócitos T e B, eritrócitos, megacariócitos / plaquetas, basófilos/mastócitos, eosinófilos, neutrófilos/granulócitos e monócitos/macrófagos; (2) possuem um potencial muito alto de proliferação; (3) são capazes de proliferar sem sofrer diferenciação, fenômeno chamado de auto-renovação. Essa capacidade de se auto-renovar é de extrema importância para a manutenção do número normal de CTHs em cada indivíduo, uma vez que elas são constantemente recrutadas para a diferenciação após estresses fisiológicos (como

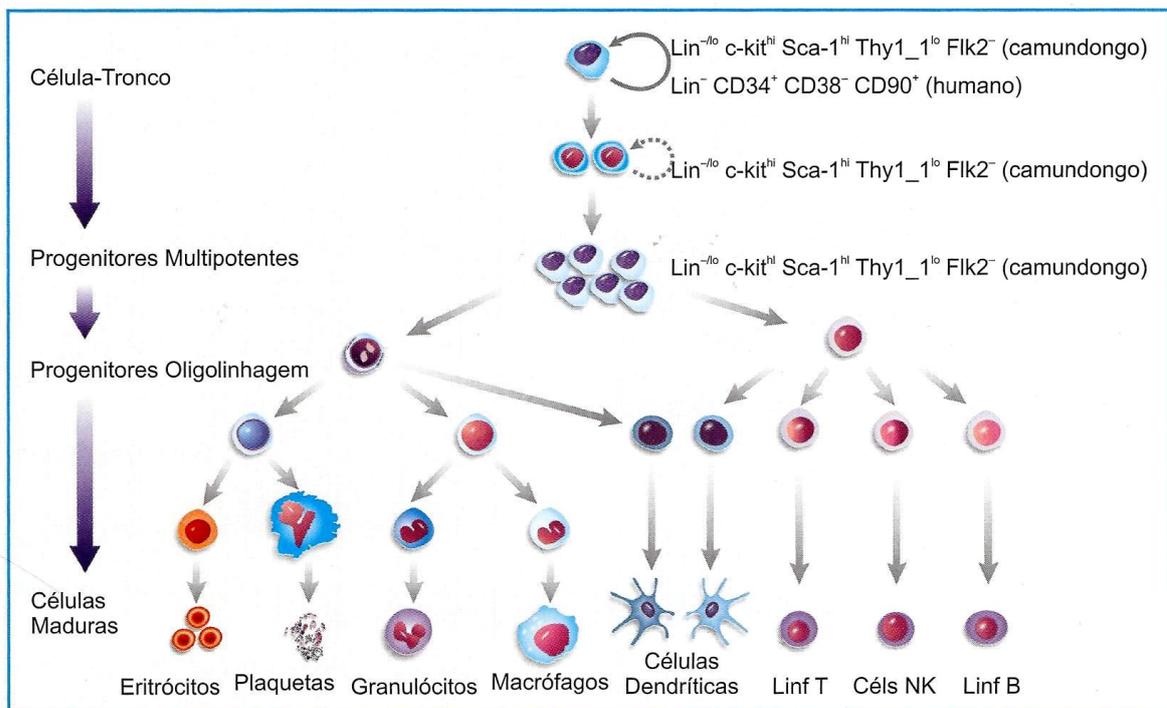
na hipóxia, onde as CTHs devem aumentar os números de eritrócitos) ou patológicos (como em infecções, para amplificar granulócitos e macrófagos) (Szilvassy 2003, Bellantuono 2004, Wilson *et al.* 2007).

O sistema hematopoiético está organizado como uma hierarquia de tipos celulares capazes de gerar clones (clonogênicos), com capacidades diferenciadas de auto-renovação, proliferação e diferenciação. No ápice dessa hierarquia estão as CTHs mais primitivas, que são consideradas quiescentes, e, portanto se dividem raramente e muito devagar. Entretanto, em resposta a um estresse hematológico, essas CTHs são recrutadas e sofrem uma série de divisões, seguidas ou não de diferenciação. Portanto, em um dado momento, as CTHs geradas por auto-renovação podem coexistir com várias classes de células progenitoras com potencial progressivamente restrito de proliferação e diferenciação. Finalmente, as CTHs se diferenciam em células precursoras e maduras de linhagens linfóides ou mielóides (figuras 4 e 5). As células sanguíneas maduras têm um tempo de vida finito, que varia de 1 dia (neutrófilos) a 120 dias (eritrócitos) em humanos. A manutenção dos números dessas células requer a ativação sucessiva de clones de CTHs. Esse processo é altamente regulado por uma série de componentes do estroma da medula óssea em indivíduos adultos, que é um microambiente complexo onde residem as CTHs, também chamado de nicho hematopoiético (Coulombel 2004, Huang *et al.* 2007).

As CTHs multipotentes, capazes de proliferação por longos períodos e auto-renovação são consideradas células hematopoiéticas primitivas e correspondem a menos de 0,1% das células hematopoiéticas na medula óssea (Szilvassy 2003, Wilson *et al.* 2007).



Esquema 4: Representação esquemática do desenvolvimento hematopoiético. Fonte: Junqueira e Carneiro, 2007.



Esquema 5: Hierarquia do sistema hematopoiético. As células sanguíneas maduras originam-se de um precursor comum, através de várias etapas de maturação (Fonte: Nardi e Alfonso 2006).

As células-tronco hematopoiéticas possuem 4 a 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresentam citoplasma delgado com poucas organelas, com numerosos ribossomos e mitocôndrias e núcleo arredondado com heterocromatina dispersa. As CTHs humanas são caracterizadas pela alta expressão do marcador específico CD34, além da expressão variável de c-kit (receptor tirosino-quinase) e Thy-1 (de thimus, inicialmente descrito em timócitos), e expressão baixa ou ausente de CD38. Em camundongos e ratos, as CTHs são caracterizadas pela alta expressão do antígeno de célula-tronco – Sca-1 (Stem Cell Antigen 1), do antígeno do complexo principal de histocompatibilidade de classe I, o H-2K, pela expressão em quantidades variáveis de c-kit e Thy-1, além da ausência de antígenos específicos de células comprometidas com linhagens hematopoiéticas (são linhagem-negativas, ou Lin<sup>-</sup>), como por exemplo, marcadores de linfócitos (CD45R/B220, CD3, CD4, CD8), de células mielóides (CD11b/Mac-1, Ly-6G/Gr-1) e de eritrócitos (TER-119) (esquemas 5 e 6). Em camundongos e ratos, a maioria das CTHs primitivas é CD34<sup>-</sup>, enquanto as células progenitoras são CD34<sup>+</sup>. As CTHs mais primitivas são também conhecidas como LSK ou KLS (Lin<sup>-</sup>SCA1<sup>+</sup>KIT<sup>+</sup>), e podem ser divididas em CD34<sup>-</sup>, com capacidade de manter a hematopoiese por longo tempo após transplante, e em CD34<sup>+</sup>, CTHs menos primitivas, com capacidade hematopoiética de curto período e pouca capacidade auto-renovadora (esquemas 5 e 6) (Bellantuono 2004, Coulombel 2004, Huang *et al.* 2007, Wilson *et al.* 2007).

O CD133 (ou AC133, prominin-1) é uma glicoproteína transmembrana de função ainda indefinida, expressa na maioria das CTHs humanas CD34<sup>+</sup> de medula óssea, fígado fetal, cordão umbilical e sangue periférico normal ou mobilizado. Além disso, o CD133 também é expresso nas CTHs de camundongos e ratos (Yin *et al.* 1997, Wilson *et al.* 2007).



Esquema 6: Expressão de marcadores pelas células-tronco hematopoiéticas primitivas e seus progenitores. LT-HSC (long-term hematopoietic stem cell) – célula-tronco hematopoiética primitiva capaz de sustentar a hematopoiese por longo período após o transplante em animais irradiados. ST-HSC (short-term hematopoietic stem cell) – célula-tronco hematopoiética menos indiferenciada, capaz de sustentar a hematopoiese por curto período após o transplante em animais irradiados. MMP (multipotent progenitor) – célula progenitora multipotente (Fonte: Wilson *et al.* 2007).

#### 4.3 Células-tronco Mesenquimais de medula óssea

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células não-hematopoiéticas que residem na medula óssea, juntamente com as CTHs. Foram primeiramente descritas como células aderentes, com capacidade clonogênica ou auto-renovadora e plásticas, pois essas CTMs podem dar origem a linhagens osteoblásticas, adipogênicas ou condrogênicas. O isolamento de CTMs de medula óssea inicia-se da mesma maneira que as CTHs, utilizando o gradiente de densidade com Hystopaque (Ficoll), que separa a fração de células mononucleares. Posteriormente, as CTMs são separadas das CTHs e das outras células mononucleares da medula óssea pela sua capacidade de aderir em plástico após algumas horas em cultura. As CTMs, entretanto, constituem apenas cerca de 0,01% a 0,001% das células mononucleares da medula óssea, formando colônias de células aderentes com fenótipo de fibroblastos (CFU-F – unidades formadoras de colônias – fibroblasto) *in vitro* (Bobis *et al.* 2006, Kolf *et al.* 2007).

As CTMs constituem uma população heterogênea de células em termos de expressão de antígenos de superfície, morfologia e fisiologia. Ainda não há um marcador único específico para CTMs, e sua caracterização depende de um coquetel de anticorpos, que por sua vez são também expressos por outros tipos

celulares (Kolf *et al.* 2007). Portanto, as CTMs da medula óssea expressam os antígenos de superfície celular CD44, CD105, CD106 (ou VCAM-1), CD29, CD166, CD73, CD117 e STRO-1. Além disso, CTMs expressam antígenos em comum com as CTHs, como Sca-1 e Thy-1 (CD90). Os outros marcadores típicos das linhagens hematopoiética ou endotelial, como CD34, CD133 (CTHs), CD11b, CD14, CD31, CD33, e CD45 não são expressos pelas CTMs (Docheva *et al.* 2007).

As CTMs expressam uma variedade de moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, todos associados com sua função e interações celulares no estroma da medula óssea. A auto-renovação e manutenção do pool de CTMs na medula óssea são realizadas pelo fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF), entre outras citocinas (Kolf *et al.* 2007).

Sabe-se que as CTMs de medula óssea produzem uma variedade de citocinas envolvidas na migração (fator derivado do estroma 1 ou SDF-1), proliferação e diferenciação das CTHs, como fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF), fator de célula-tronco (SCF) e IL-6. Na medula óssea, as CTMs podem se diferenciar em osteoblastos e fibroblastos, também capazes de manter e regular o pool de CTHs. Além disso, as CTMs possuem função imunoreguladora, inibindo, por exemplo, as respostas inflamatórias e a proliferação de linfócitos T aloreativos após um transplante alogênico de medula óssea. Os linfócitos B e células dendríticas também sofrem inibição pelas CTMs (Bobis *et al.* 2006).

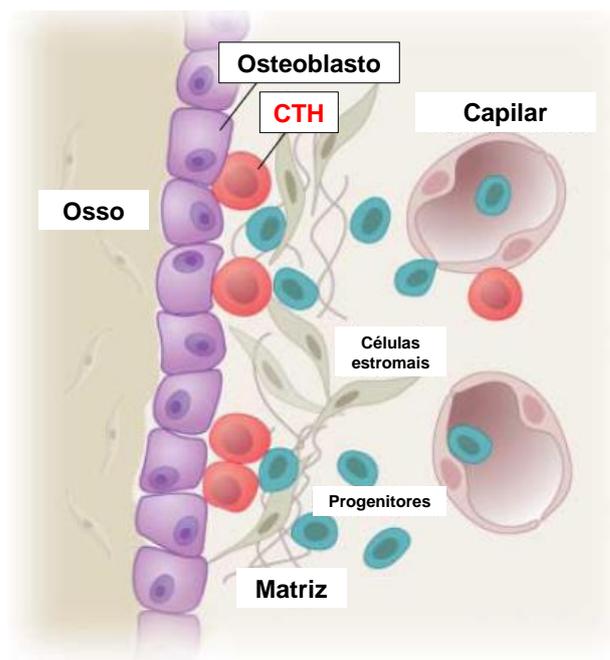
#### **4.4 Medula óssea e o Nicho Hematopoiético**

O nicho de células-tronco pode ser definido como uma estrutura espacial na qual as células-tronco residem e são mantidas através da auto-renovação na ausência de diferenciação. A primeira evidência direta de que células formadoras do osso tinham atividade de suporte das células-tronco surgiu a partir de estudos com linhagens de osteoblastos e de células estromais da medula óssea de humanos e de camundongos. Verificou-se que esses osteoblastos e células estromais secretam um grande número de citocinas que promovem a proliferação *in vitro* de CTHs (Arai e Suda 2007, Wilson *et al.* 2007).

Estudos demonstraram que os osteoblastos presentes no estroma da medula óssea são um fator limitante para a população de CTHs e sua atividade no nicho. Além dos osteoblastos, os osteoclastos, fibroblastos estromais e células endoteliais da medula óssea também parecem contribuir para a manutenção das CTHs (esquema 7) (Moore e Lemischka 2006, Wilson *et al.* 2007).

Dados recentes sugerem uma complexa interação molecular entre as células do nicho na medula óssea e as CTHs, envolvendo caderinas, integrinas, citocinas, quimiocinas, moléculas de sinalização e seus receptores. Essa interação pode ocorrer de duas maneiras: (1ª) interações adesivas entre as CTHs e a matriz extracelular, como a ligação do receptor CD44 nas CTHs à osteopontina (OPN); e (2ª) interações célula-célula. A principal função dessas interações seria manter as CTHs em contato íntimo às células no nicho do endóstio da medula óssea (Adams e Scadden 2006, Blank *et al.* 2007, Wilson *et al.* 2007).

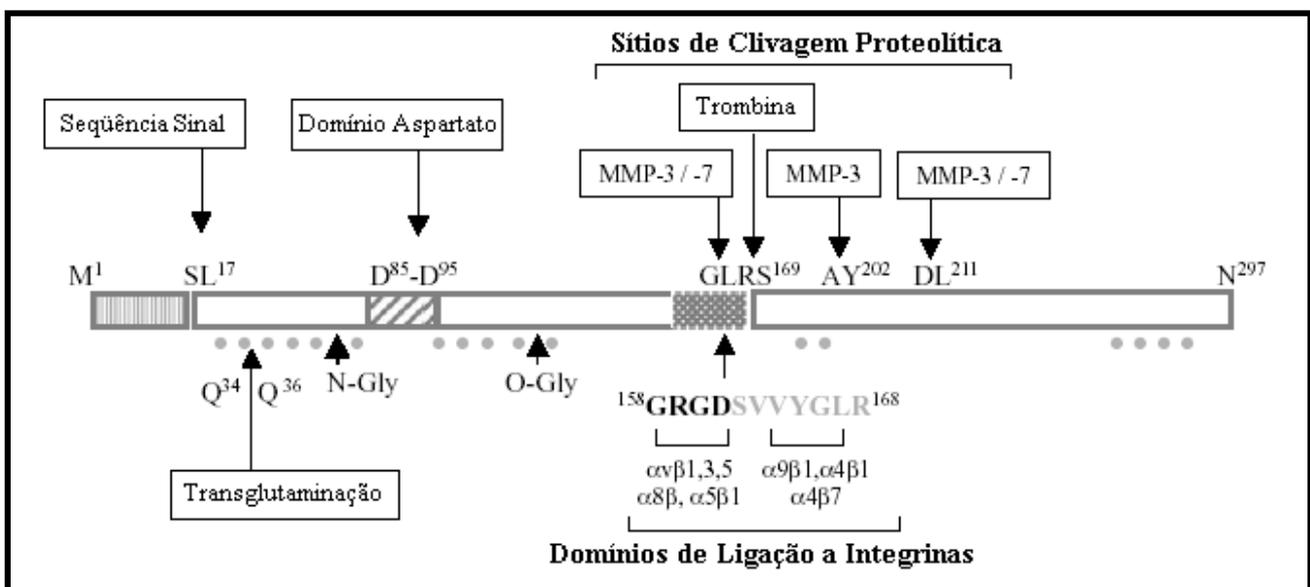
A osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína não-colagenosa, rica em ácido siálico (Denhardt e Guo 1993). Possui uma região ácida e uma seqüência RGD (arginina-glicina-aspartato), que é fundamental para adesão celular e quimiotaxia, e também participa da sinalização celular mediada por integrinas. A OPN se liga ao colágeno tipo I, fibronectina, osteocalcina e integrinas, em particular  $\alpha_v\beta_3$  (receptor de vitronectina),  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e também ao receptor de ácido hialurônico CD44 e seus variantes (esquema 8) (O'Regan 2003, Kazaneki *et al.* 2007).



Esquema 7: Representação da célula-tronco hematopoiética (CTH) na medula óssea. Adaptado de Moore et al., 2007.

Apesar de ocorrer uma distribuição limitada da OPN em tecidos saudáveis (está presente principalmente nos ossos, rins e fígado), estudos com esta proteína durante doenças ou lesões revelaram que ocorre um aumento acentuado sob condições inflamatórias e de remodelamento tecidual (Lorena *et al.* 2006). Fontes de OPN incluem células epiteliais, endoteliais, musculares lisas, fibroblastos, osteoblastos e células tumorais. Essa proteína também é expressa por células T, macrófagos (incluindo células derivadas de macrófagos, como células de Kupffer) e células NK. Também é um regulador do remodelamento ósseo, onde a OPN parece estar envolvida na diferenciação do osteoblasto e formação do osso, assim como no ancoramento de osteoclastos ao osso e conseqüente reabsorção óssea (O'Regan, 2003; Kazanecki *et al.* 2007).

Na medula óssea, um mecanismo pelo qual os osteoblastos regulam as CTHs é através da secreção de OPN. Camundongos deficientes de OPN têm duas vezes mais CTHs. Além disso, CTHs normais transplantadas em camundongos nocaute para OPN irradiados também estão em número aumentado e quando as CTHs são cultivadas em meio contendo OPN, proliferam menos e sofrem apoptose. Assim, a OPN é um importante regulador negativo das CTHs, mantendo essas células quiescentes e o seu número estável no organismo (Nilsson *et al.* 2005, Stier *et al.* 2005, Adams e Scadden 2006).



Esquema 8: Representação esquemática da estrutura proteica da OPN, mostrando sítios de ligação, de clivagem, de fosforilação (•) e de glicosilação (N-gly). Adaptado de (O'Regan 2003).

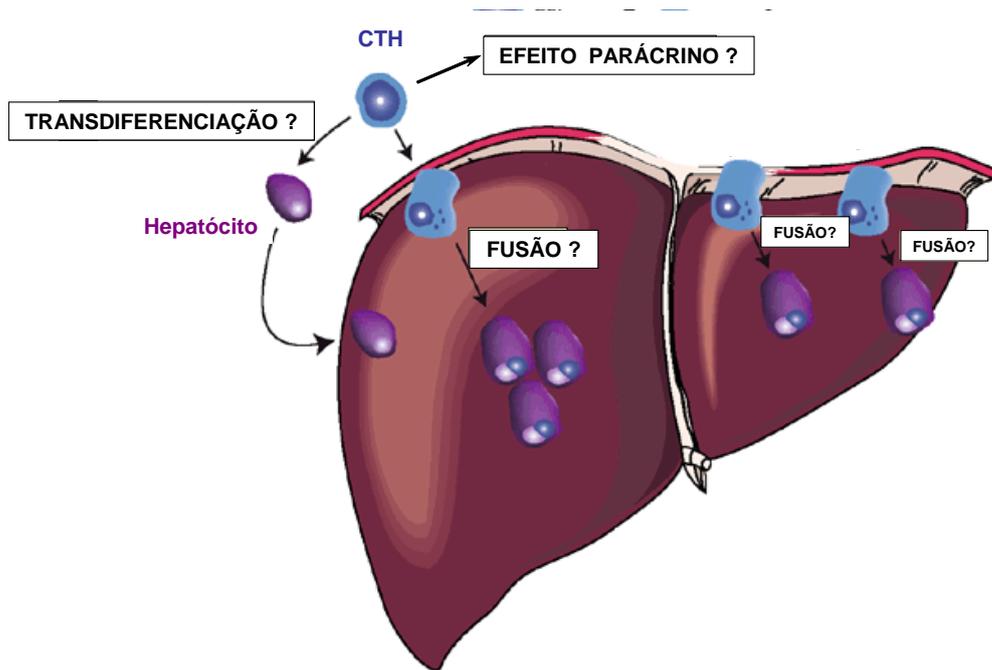
## 5 CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA E REGENERAÇÃO HEPÁTICA

### 5.1 Células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e regeneração hepática

A maioria dos hepatócitos de animais adultos tem o potencial de repovoar o fígado, e a regeneração em curto prazo não parece requerer células-tronco. Entretanto, sob certas condições, as CTHs podem contribuir significativamente para a regeneração hepática após falência do fígado (Lagasse *et al.* 2000, Austin e Lagasse 2003, Khurana e Mukhopadhyay 2007).

Alguns trabalhos sugerem que as CTHs regeneram o fígado lesionado se fusionando a hepatócitos pré-existentes (Vassilopoulos *et al.* 2003, Wang *et al.* 2003). Entretanto, outros estudos discutem a fusão celular em modelos de regeneração hepática (Jang *et al.* 2004, Masson *et al.* 2004). Atualmente, a diferenciação completa de CTHs em hepatócitos funcionais também tem sido discutida, sugerindo que esse processo seja raro e limitado. Assim, o que tem sido mais aceito é que as CTHs poderiam contribuir para a regeneração hepática secretando fatores de crescimento e citocinas importantes, induzindo a proliferação dos hepatócitos e protegendo-os da apoptose (Thorgeirsson e Grisham 2006). O esquema 9 mostra as hipóteses da participação das CTHs na regeneração hepática, pelo efeito parácrino, diferenciação em hepatócitos ou fusão a hepatócitos pré-existentes.

Após a hepatectomia parcial, as células-tronco hematopoiéticas de medula óssea contribuem principalmente para a formação de sinusóides hepáticos (Fujii *et al.* 2002).



Esquema 9: Hipóteses da participação das CTHs na regeneração hepática. Fonte: <http://www.nature.com/nm/journal/v10/n7/images/nm0704-671-F1.gif>

## 5.2 Células-tronco mesenquimais (CTMs) e regeneração hepática

Estudos recentes têm mostrado o grande potencial terapêutico das CTMs, pela sua plasticidade e papel imunoregulador. Atualmente, essas células são consideradas grandes candidatas para a terapia celular na falência hepática, com alguns estudos clínicos em andamento. Em ratos com fibrose hepática, o transplante de CTMs de medula óssea mostrou um efeito anti-fibrótico e uma diminuição significativa da deposição de colágeno e melhora da função hepática (Abdel Aziz *et al.* 2007). As CTMs em cultura na presença de HGF, um importante mitógeno para hepatócitos, e outros fatores de crescimento, são capazes de diferenciar-se em hepatócitos funcionais. Um estudo recente demonstrou que o transplante de CTMs expressando HGF preveniu a falência hepática em ratos e reduziu a mortalidade, com rápida recuperação hepática (Yu *et al.* 2007). Além disso, CTMs isoladas de medula óssea humana são capazes de enxertar no fígado de camundongos imunodeficientes e expressar marcadores de células hepáticas, como a albumina. Esses resultados também foram obtidos com ensaios *in vitro* (Aurich *et al.* 2007).

As CTMs apresentam um potencial de se diferenciar em fibroblastos e miofibroblastos no fígado com fibrose, que deve ser avaliado (Russo *et al.* 2006).

Assim, as estratégias utilizadas atualmente são a obtenção de hepatócitos a partir da diferenciação de CTMs *in vitro*, expansão desses hepatócitos e transplante em pacientes com doenças hepáticas. Isso funcionaria como uma alternativa à dificuldade de obter hepatócitos diretamente do fígado dos pacientes ou doadores. Além disso, moléculas secretadas pelas CTMs *in vitro* podem prevenir e reverter a falência hepática, e poderiam ser administradas a pacientes nessas condições (Parekkadan *et al.* 2007).

### 5.3 Mobilização de células da medula óssea para o fígado lesionado

Diversos fatores liberados pelo fígado após uma lesão participam da migração de CTHs para esse órgão, como IL-8 (interleucina-8), HGF e metaloproteinases de matriz (MMPs). Estudos demonstraram que a MMP-9 promove a liberação de células progenitoras endógenas da medula óssea para a circulação, clivando moléculas de adesão que participam das interações das CTHs com células estromais. Sabe-se que a MMP-9 tem sua expressão aumentada e papel ativo na remodelação hepática após cirrose ou fibrose e inflamação, além de regular a regeneração de hepatócitos após hepatectomia parcial (Dalakas *et al.* 2005).

Assim, nos últimos anos tem existido um grande interesse em novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças hepáticas em estágio terminal e o transplante de células-tronco adultas obtidas de medula óssea tem oferecido grandes perspectivas (Ruhnke *et al.* 2005, Levicar *et al.* 2007).

## 6 JUSTIFICATIVA

A grande questão no momento sobre o estudo de células-tronco é a identificação dos sinais que levam uma célula-tronco a **(1º)** migrar para um determinado local e **(2º)** se tornar uma célula especializada, i. é, diferenciada. Os sinais para a migração, adesão e diferenciação celular incluem substâncias secretadas por outras células, contato com células vizinhas e certos tipos de moléculas existentes no micro-ambiente tecidual, como por exemplo, componentes da matriz extracelular. Muitas dessas questões relativas à migração, adesão e diferenciação das células-tronco ainda permanecem incompreendidas.

A lesão hepática pode induzir a expressão e secreção de mediadores da sinalização como interleucinas, metaloproteinases, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, que facilitariam a migração e o transplante de células-tronco hematopoiéticas no fígado. Portanto, uma melhor compreensão desses fatores regulando o transplante de células-tronco no fígado é essencial para o sucesso da terapia celular em doenças hepáticas (Dalakas *et al.* 2005).

Assim, a “análise da expressão de laminina durante o transplante de células mononucleares de medula óssea após a hepatectomia parcial em ratos” pretendeu avançar na compreensão da interação dessas células de medula óssea com o tecido hepático durante a regeneração do fígado.

## **7 OBJETIVOS**

O presente projeto teve como objetivos gerais investigar a possível interação de uma proteína de matriz extracelular, laminina, com células mononucleares de medula óssea transplantadas em fígados de ratos hepatectomizados, e analisar a expressão de osteopontina em células mononucleares de medula óssea de ratos.

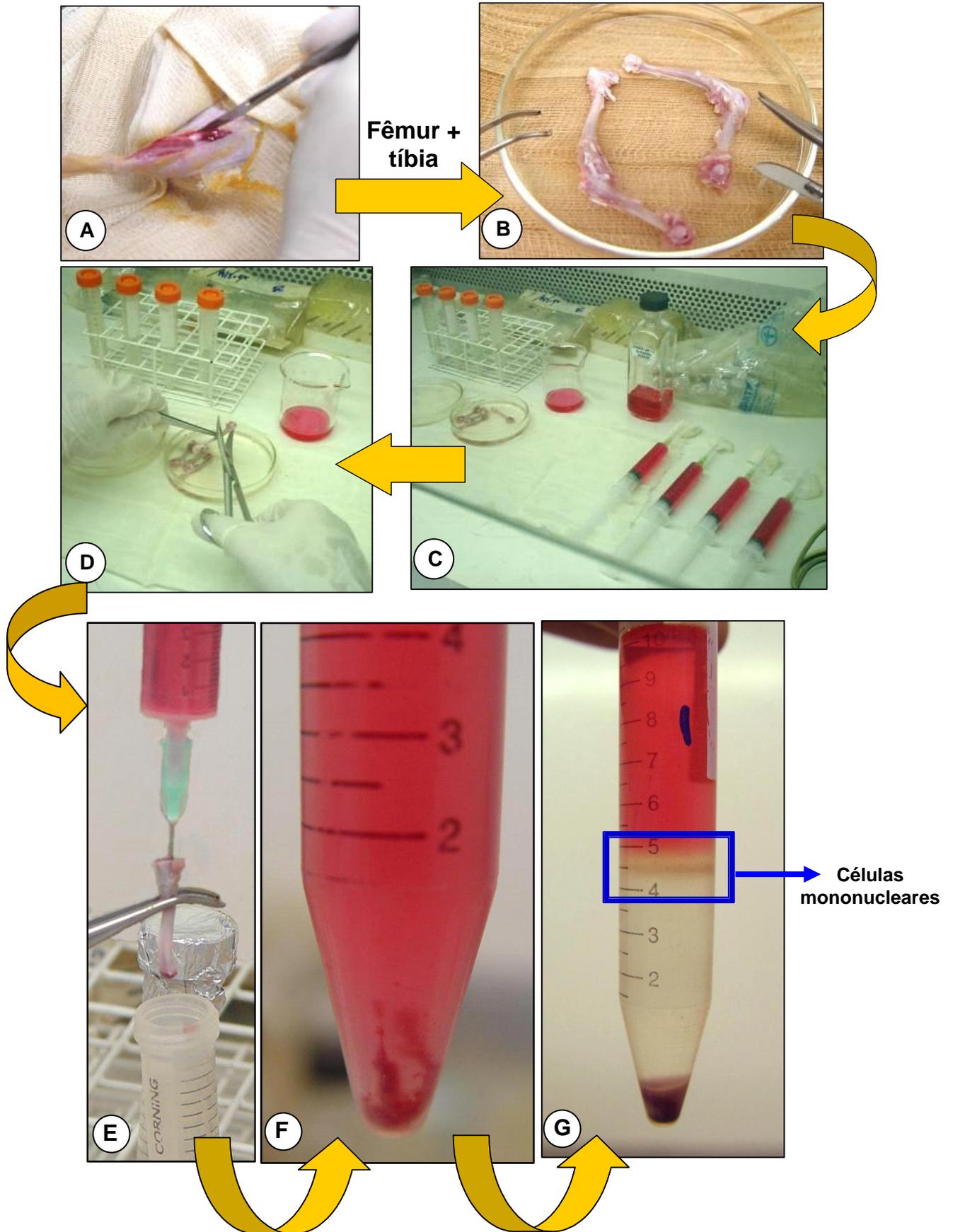
### **Objetivos específicos:**

- 1-** Analisar a expressão e distribuição de laminina no fígado de ratos em diferentes períodos após a cirurgia de hepatectomia parcial.
  
- 2-** Analisar a possível participação da laminina no fígado de ratos hepatectomizados e em seguida, transplantados com células mononucleares de medula óssea, em diferentes períodos da regeneração hepática.
  
- 3-** Analisar a expressão de osteopontina em células mononucleares de medula óssea de ratos.

## 8 METODOLOGIA

### 8.1 Isolamento de células mononucleares da medula óssea de ratos

Os fêmures e tíbias de ratos Wistar machos de 2 meses de idade foram dissecados e as epífises, cortadas. Em seguida foi injetado meio de cultura DMEM (Sigma) com uma agulha de 20G nas extremidades medulares expostas para coleta das células (esquema 10, A, B, C e D). Após centrifugação a 1 500 RPM por 15 min, as células foram ressuspendidas em 5 mL de DMEM e submetidas a um gradiente de centrifugação com Ficoll-Hystopaque 1077 (Sigma) a 2 000 RPM por 30 min (esquema 10, E, F, G). O anel contendo células mononucleares foi coletado e lavado 6 vezes com DMEM a 1 500 RPM por 8 min. Em seguida, as células foram incubadas com corante nuclear DAPI a 5 µg/mL por 30 min em estufa a 37° C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, lavadas 6 vezes com DMEM, contadas e transplantadas nos ratos receptores recém-hepatectomizados.



Esquema 10: Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos.

## 8.2 Hepatectomia de 70% e transplante de células mononucleares da medula óssea

Ratos Wistar adultos (4 meses de idade) pesando cerca de 300g foram anestesiados com halotano volátil e, após a assepsia do campo cirúrgico, foi feita uma incisão na cavidade peritoneal. Em seguida foi realizada a ligadura da veia porta e do colédoco do fígado com fio de poliglactina 5-0 (Vycril<sup>®</sup>, Ethicon – Johnson & Johnson). As veias supra-hepáticas dos lobos mediano e esquerdo foram pinçadas, e esses lobos foram retirados, caracterizando a hepatectomia parcial. Em seguida, os animais receberam transplante intraportal de células mononucleares de medula óssea previamente isoladas e marcadas com DAPI.

## 8.3 Grupos experimentais

Nos grupos que receberam transplante de células de medula óssea, foram injetadas cerca de  $1 \times 10^7$  células previamente marcadas com DAPI na veia porta hepática. Posteriormente, o abdome foi fechado com fio de poliglecaprone 3-0 (Monocryl<sup>®</sup>, Ethicon – Johnson & Johnson). Os animais foram divididos em 6 grupos (n = 5 em cada grupo):

**3 Grupos controle hepatectomizados**, de animais que foram sacrificados 15 min, 1 dia e 3 dias após a hepatectomia;

**3 Grupos hepatectomizados + células de medula óssea**, de animais que foram hepatectomizados e em seguida inoculados com células de medula óssea e sacrificados 15 min, 1 dia e 3 dias após a hepatectomia.

## 8.4 Processamento de tecido hepático para microscopia de fluorescência

Após o sacrifício, os fígados de todos os grupos experimentais foram retirados, congelados em nitrogênio líquido, clivados e guardados em freezer a -70° C. Os cortes de 4 a 5  $\mu\text{m}$  foram feitos em criostato após inclusão em resina hidrofílica Tissue Tek. Em seguida foram fixados em acetona a -20° C e duplamente

marcados com os seguintes anticorpos primários overnight: anti-CD34 de rato obtido em camundongo 1:100 e/ou anti-laminina de rato obtido em coelho 1:50. Os cortes foram lavados com PBS-albumina e incubados por 1h com anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com FITC 1:100 e/ou anti-coelho conjugado com TRITC ou FITC 1:50. Alguns cortes foram incubados com o corante Azul de Evans 1:20.000, que confere fluorescência vermelha aos hepatócitos. Os cortes foram montados em lâminulas com N-propil-galato e observados em microscópio confocal de fluorescência.

### **8.5 Análise da expressão de osteopontina (OPN) em células de medula óssea e células-tronco hematopoiéticas (CTHs)**

Para caracterização das células mononucleares da medula óssea de ratos, após o isolamento, essas células foram aderidas em lâminas por uma centrífuga cytospin a 300 RPM e processadas para imunofluorescência. Células de medula óssea de ratos também foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas previamente revestidas com gelatina a 2%, em meio completo (DMEM + soro fetal bovino 20% + gamicina, penicilina e estreptomicina a 1% e fungizona a 0,5%) por até 4 dias e processadas para imunofluorescência.

Para o processamento, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 min, em seguida incubadas com cloreto de amônio 5 mM em PBS pH 8,0 por 30 min, lavadas com PBS-albumina e incubadas com anticorpos primários anti-CD34 de rato obtido em camundongo 1:100 e anti-OPN de rato obtido em cabra 1:100 overnight. Em seguida foram utilizados anticorpos secundários anti-camundongo conjugado com FITC 1:100 e anti-cabra biotilado 1:100 por 1h, e estreptavidina-Cy3 1:100 por 1h. As lâminas e lamínulas foram montadas com N-propil-galato e observadas em microscópio confocal.

## **8.6 Citometria de Fluxo para OPN de células mononucleares da medula óssea**

Para caracterização das células mononucleares da medula óssea de ratos, após o isolamento as células foram fixadas em paraformaldeído a 1% por 30 min, lavadas com PBS e soro fetal bovino a 1% e incubadas por 30 min com o anticorpo primário anti-OPN de rato obtido em cabra 1:20. Em seguida as células foram lavadas e incubadas por 20 min com o anticorpo secundário anti-cabra conjugado com Cy3 1:300. As células foram novamente lavadas e levadas para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur. A análise dos dados obtidos foi realizada com o programa WinMDI 2.8.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Expressão de laminina após hepatectomia de 70%

No fígado, 15 minutos após a hepatectomia, observamos que a expressão de laminina se restringe aos principais vasos hepáticos, localizados no espaço porta e na veia centrolobular. Não foi observada expressão de laminina nos capilares sinusóides (figuras 1, 2 e 3). Entretanto, um dia e três dias após a hepatectomia parcial, foi observado um aumento na expressão de laminina ao redor dos vasos das veias porta (Figuras 5, 7 e 8) e centrolobular (Figura 6). Além disso, foi evidenciada a expressão de laminina nos sinusóides hepáticos (Figuras 4 a 8). Três dias após a hepatectomia, observamos também a proliferação de células vasculares e ductais no espaço porta (Figura 7), bem como de hepatócitos, que aparecem binucleados (Figura 8).

### 9.2 Expressão de laminina após hepatectomia de 70% e transplante de células de medula óssea

Após 15 minutos do transplante de células de medula óssea marcadas com DAPI pela veia porta em fígados recém-hepatectomizados, a análise por microscopia confocal demonstrou uma célula-tronco hematopoiética transplantada em contato com a veia porta expressando laminina. Essa célula foi identificada pela marcação com DAPI e pela expressão de CD34 (Figura 10). A expressão de CD34 também pode ser observada, mais fracamente, no endotélio do espaço porta.

Entretanto, 1 dia (Figuras 11, 12 e 13) e 3 dias (Figuras 14 a 19) após a hepatectomia, as células de medula óssea transplantadas foram observadas principalmente nos sinusóides hepáticos expressando laminina. Além disso, as células de medula óssea foram observadas próximas aos espaços porta 1 dia (Figuras 11 e 12) e 3 dias (Figuras 14, 15) após a hepatectomia. Com 3 dias também foram observadas células de medula óssea próximas à veia centrolobular (Figura 16).

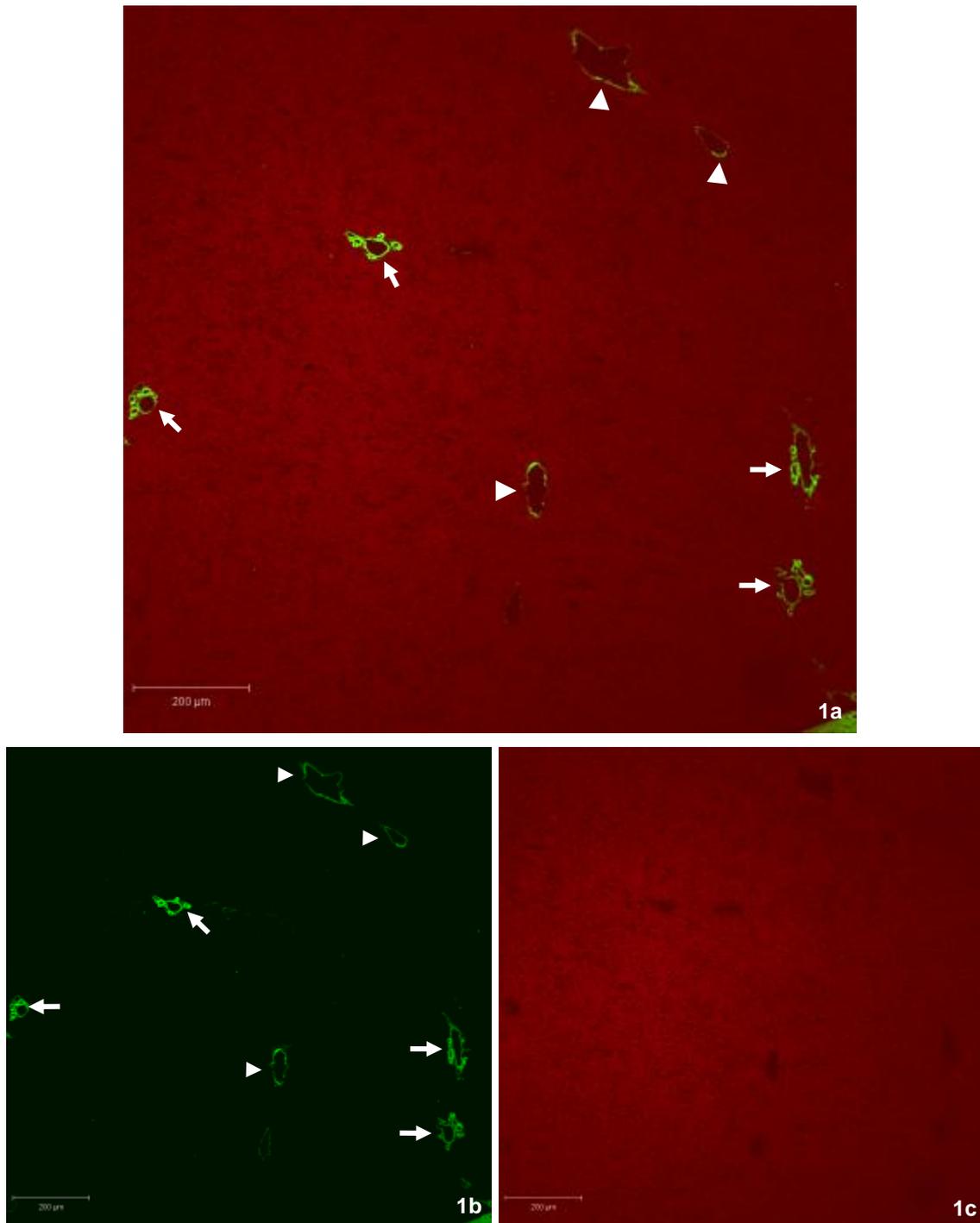


Figura 1: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **15 minutos após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 25x. Barra = 200 μm. **(1a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. Os espaços porta (setas) e veias centrolobulares (cabeças de seta) apresentam forte expressão de laminina. **(1b)** Imunomarcagem para laminina. **(1c)** Coloração com Azul de Evans.

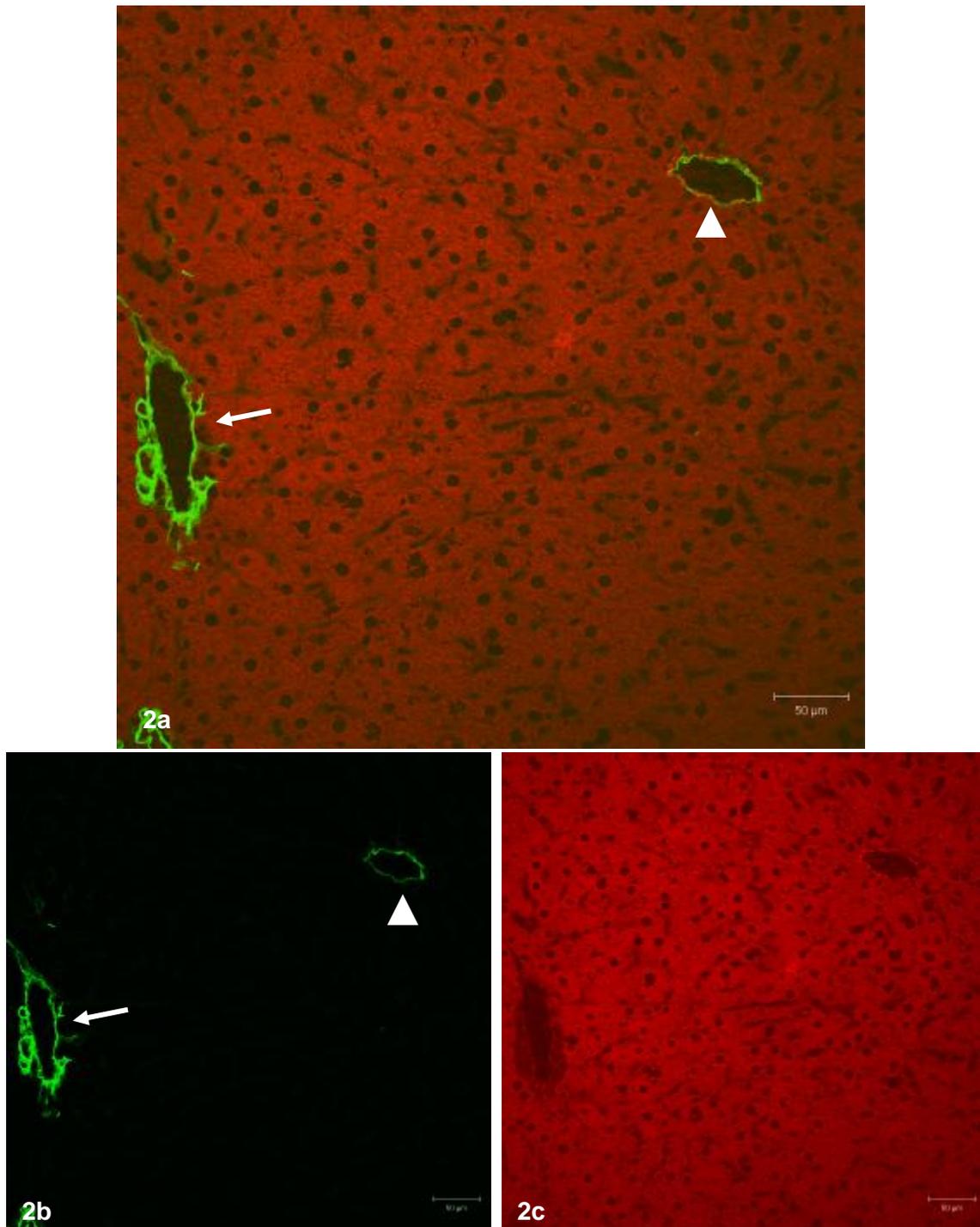


Figura 2: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **15 minutos após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 μm. **(2a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. O espaço porta (seta) e a veia centrolobular (cabeça de seta) apresentam forte expressão de laminina. A expressão de laminina ocorre principalmente ao redor dos vasos do espaço porta (seta) e da veia centrolobular (cabeça de seta), e não é observada no parênquima hepático. **(2b)** Imunomarcção para laminina. **(2c)** Coloração com Azul de Evans.

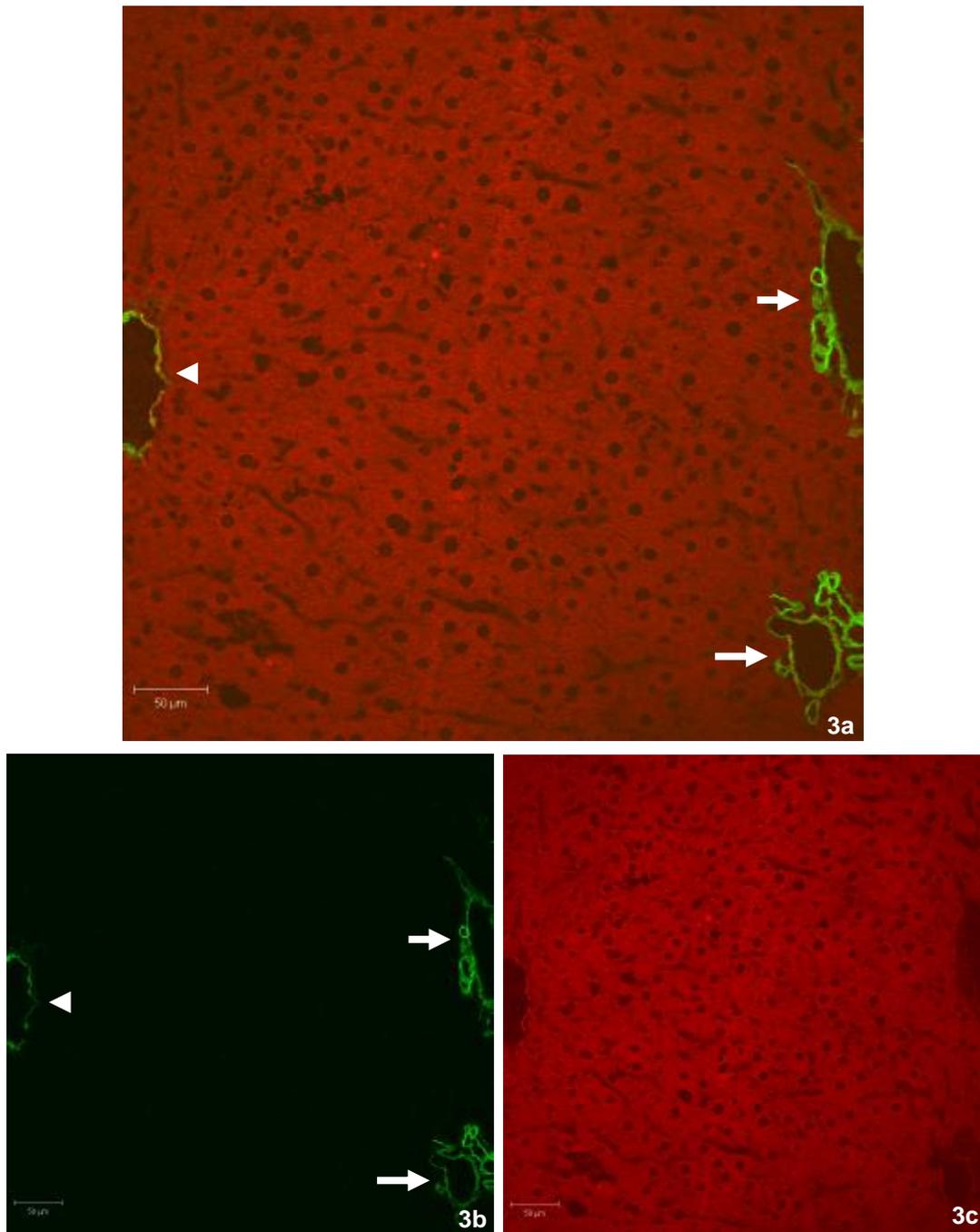


Figura 3: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **15 minutos após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(3a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. Os espaços porta (setas) e a veia centrolobular (cabeça de seta) apresentam forte expressão de laminina. A expressão de laminina ocorre principalmente ao redor dos vasos do espaço porta (setas) e da veia centrolobular (cabeça de seta), e não é observada no parênquima hepático. **(3b)** Imunomarcção para laminina. **(3c)** Coloração com Azul de Evans.

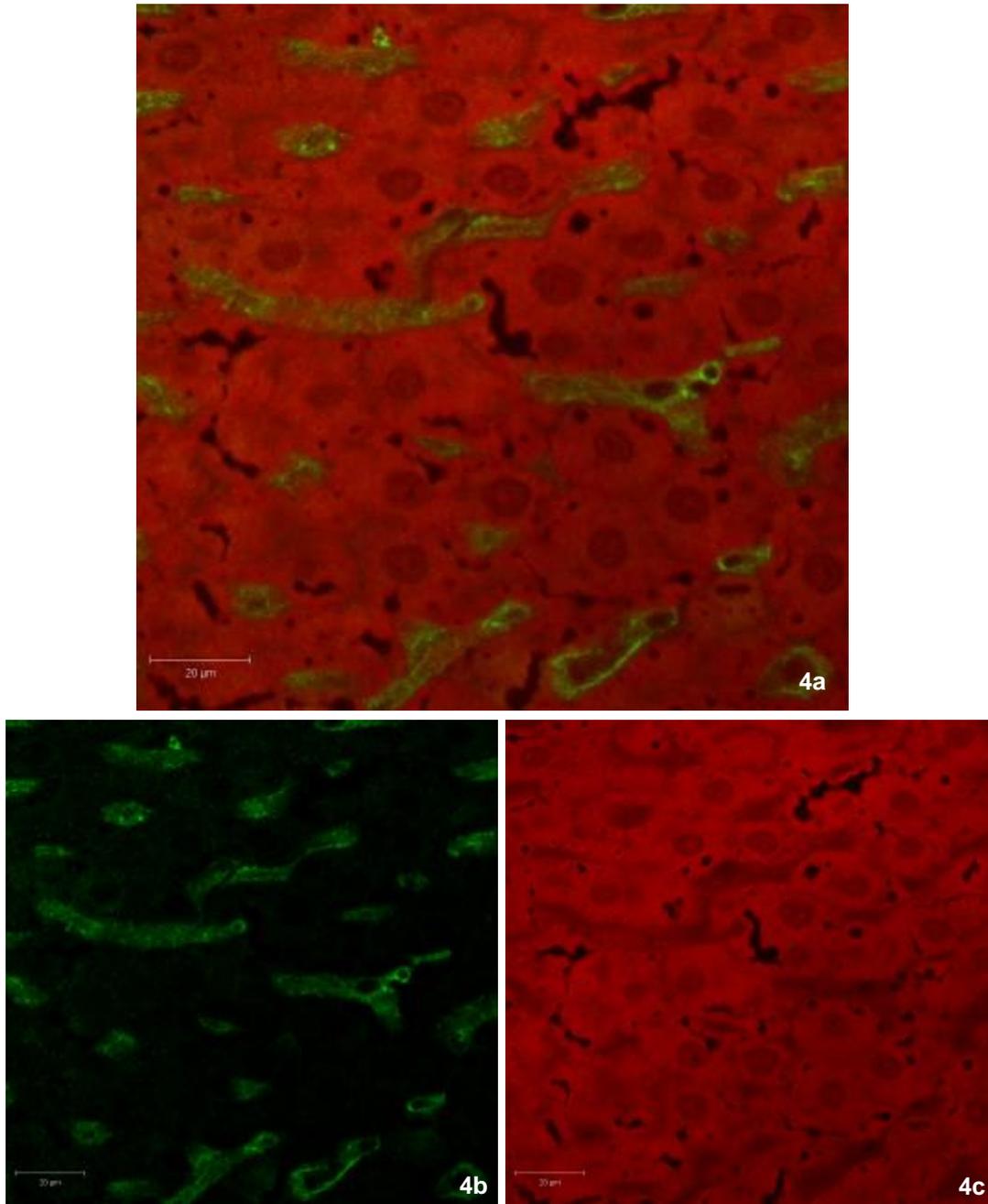


Figura 4: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **1 dia após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(4a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. A expressão de laminina é evidenciada nos capilares sinusóides do parênquima hepático. **(4b)** Imunomarcacão para laminina nos sinusóides. **(4c)** Coloração com Azul de Evans.

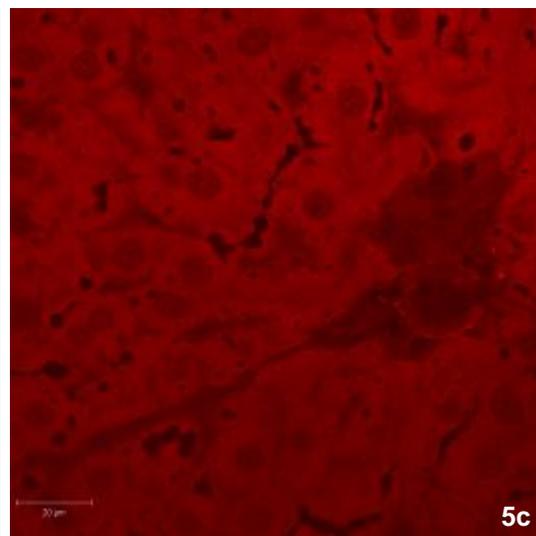
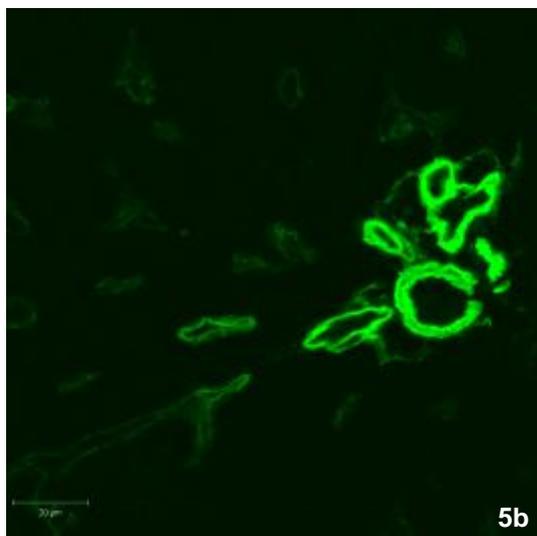
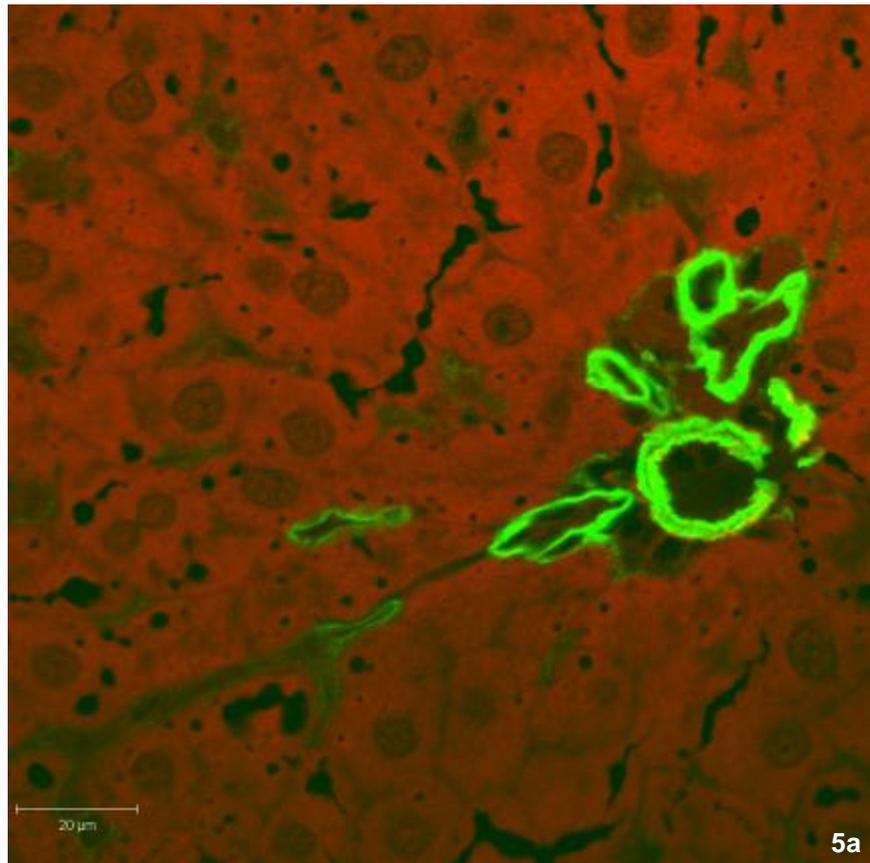


Figura 5: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **1 dia após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . **(5a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. A expressão de laminina é observada no espaço porta, bem como nos capilares sinusóides do parênquima hepático. **(5b)** Imunomarcção para laminina. **(5c)** Coloração com Azul de Evans.

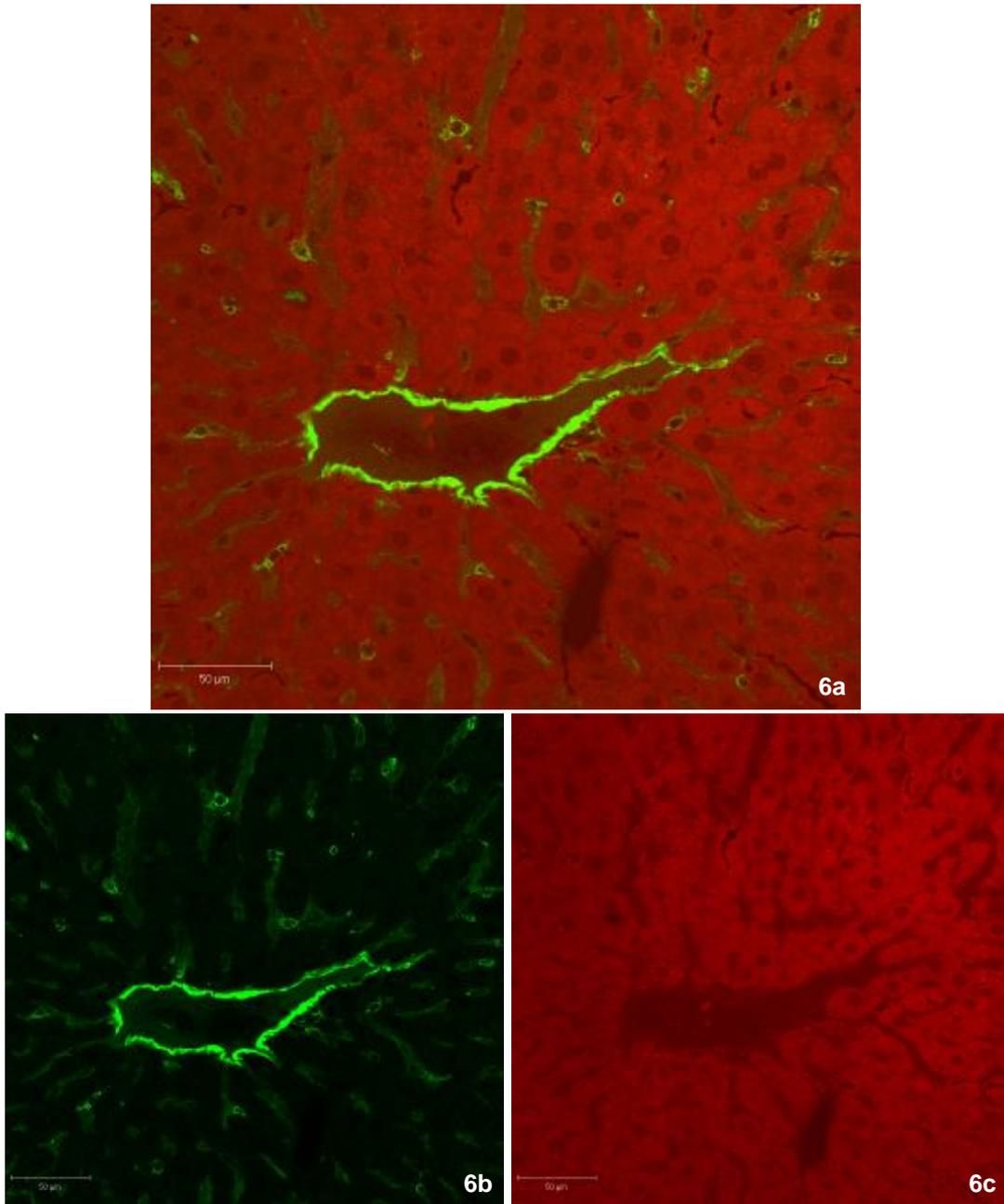


Figura 6: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **1 dia após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(6a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. A expressão de laminina é observada nos capilares sinusóides e ao redor da veia centrolobular. **(6b)** Imunomarcacão para laminina. **(6c)** Coloracão com Azul de Evans.

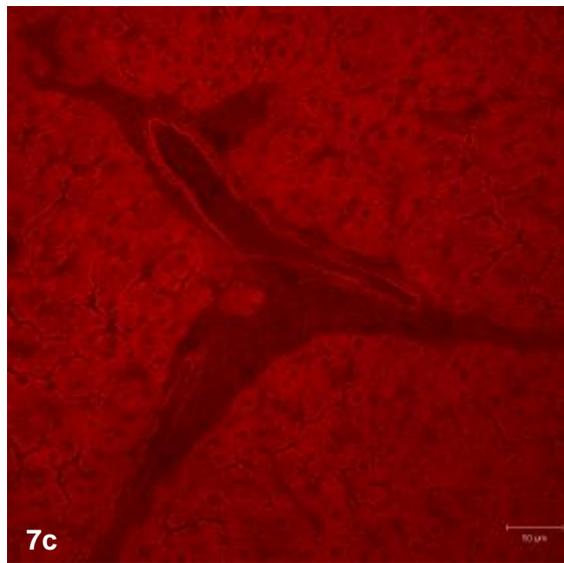
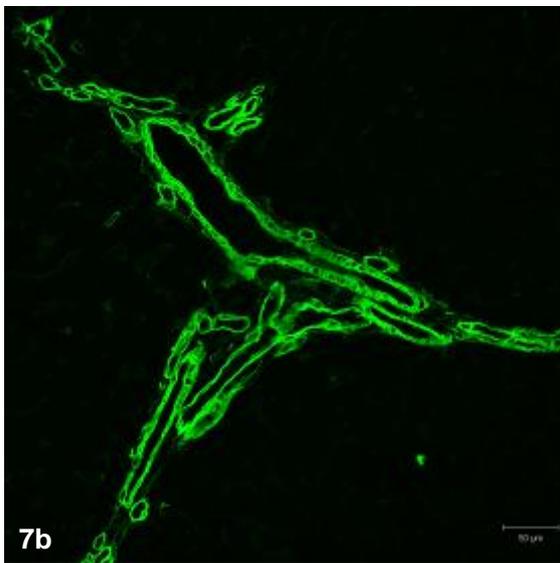
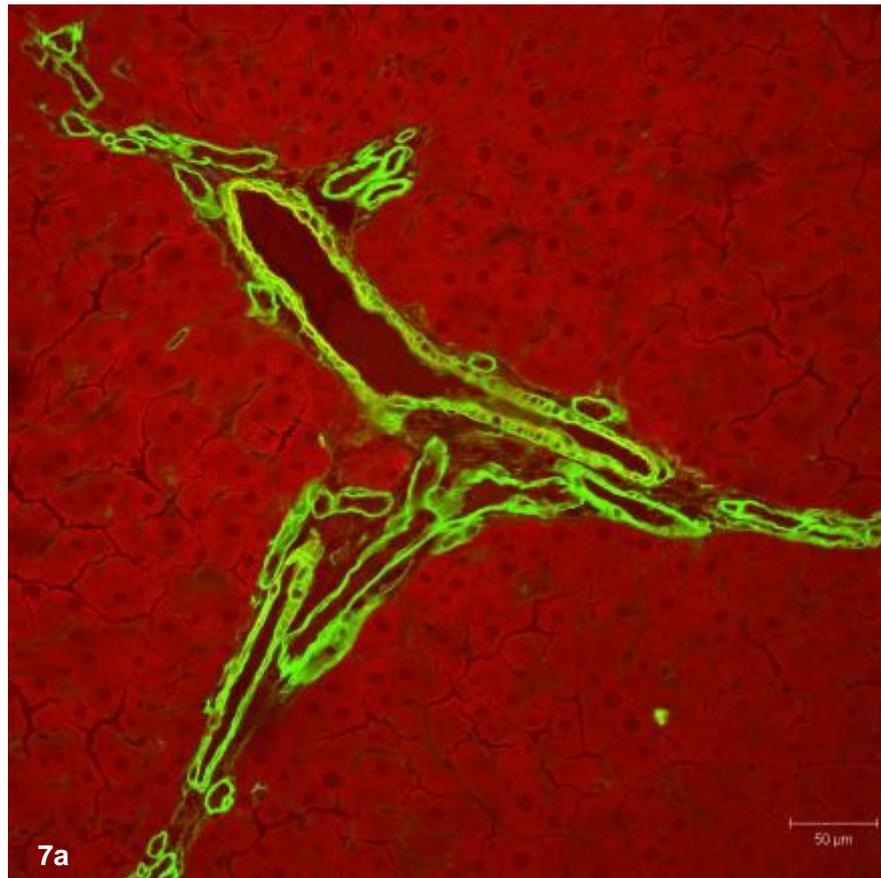


Figura 7: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **3 dias após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC – verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(7a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. A expressão de laminina é observada no espaço porta com aumento do número de ramos vasculares e ductais, indicando a proliferação dessas células após a hepatectomia. **(7b)** Imunomarcção para laminina. **(7c)** Coloração com Azul de Evans.

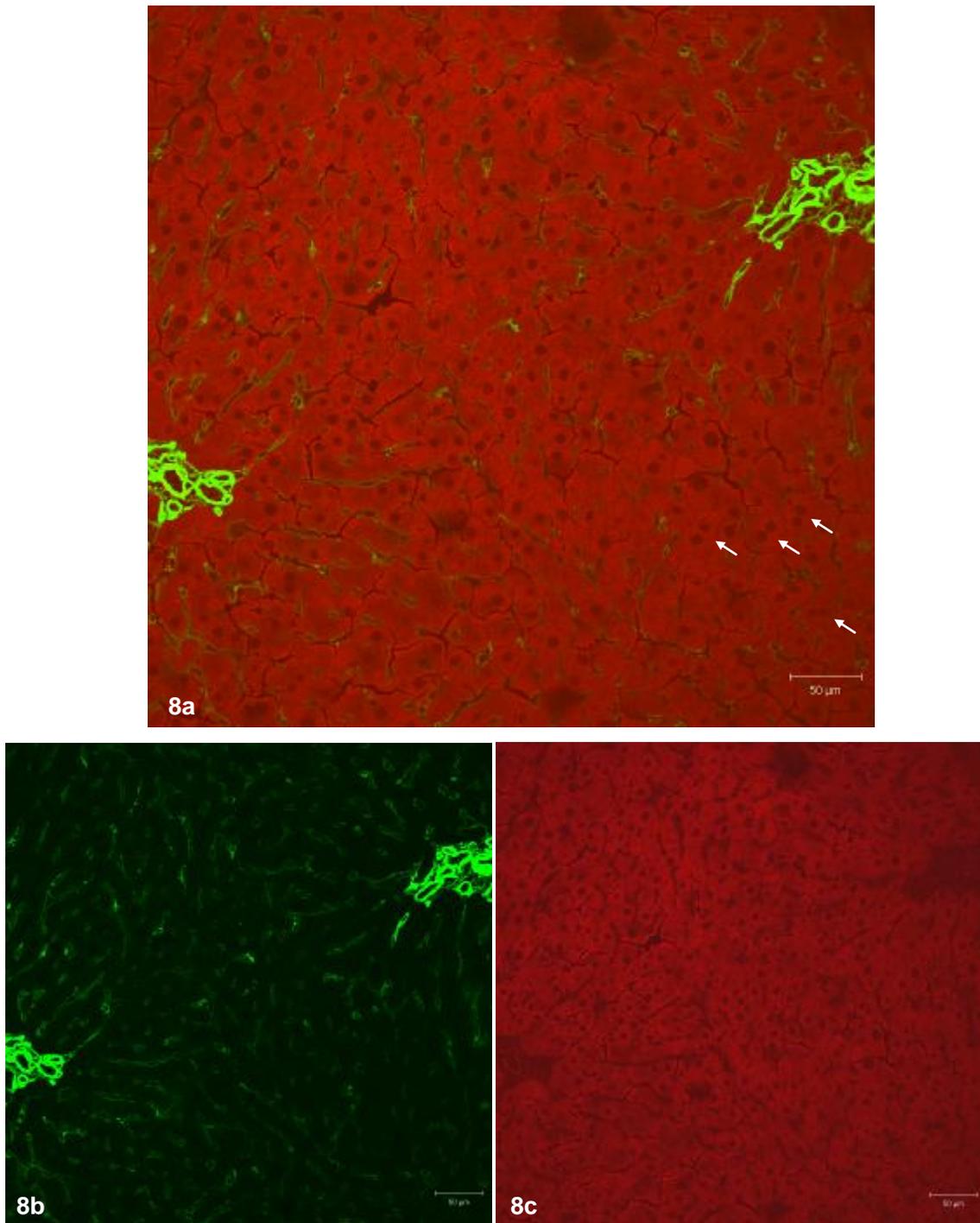


Figura 8: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **3 dias após a hepatectomia**. Imunofluorescência para laminina (FITC - verde) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 μm. **(8a)** Sobreposição das imagens de FITC (laminina) e Azul de Evans. A expressão de laminina é observada em quantidade nos espaços porta, bem como nos capilares sinusóides. As setas indicam hepatócitos binucleados em proliferação. **(8b)** Imunomarcacão para laminina. **(8c)** Coloração com Azul de Evans.

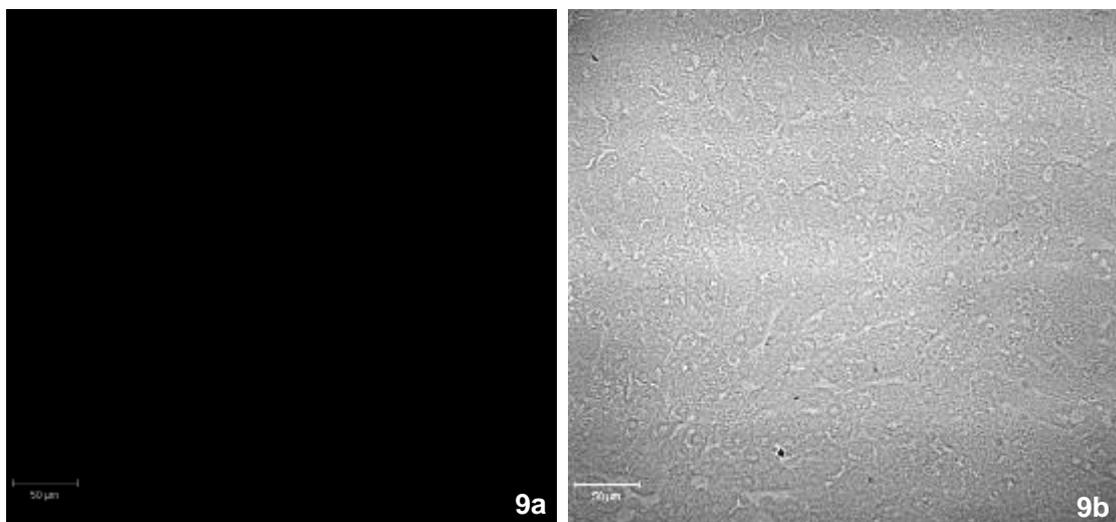


Figura 9: Microscopia confocal de fígado de rato obtido **3 dias após a hepatectomia**. Controle negativo da imunofluorescência. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado com FITC, omitindo o anticorpo primário anti-laminina. Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(9a)** Imagem de fluorescência mostrando a ausência de marcação. **(9b)** Imagem de contraste interferencial diferencial (DIC) mostrando o parênquima hepático.

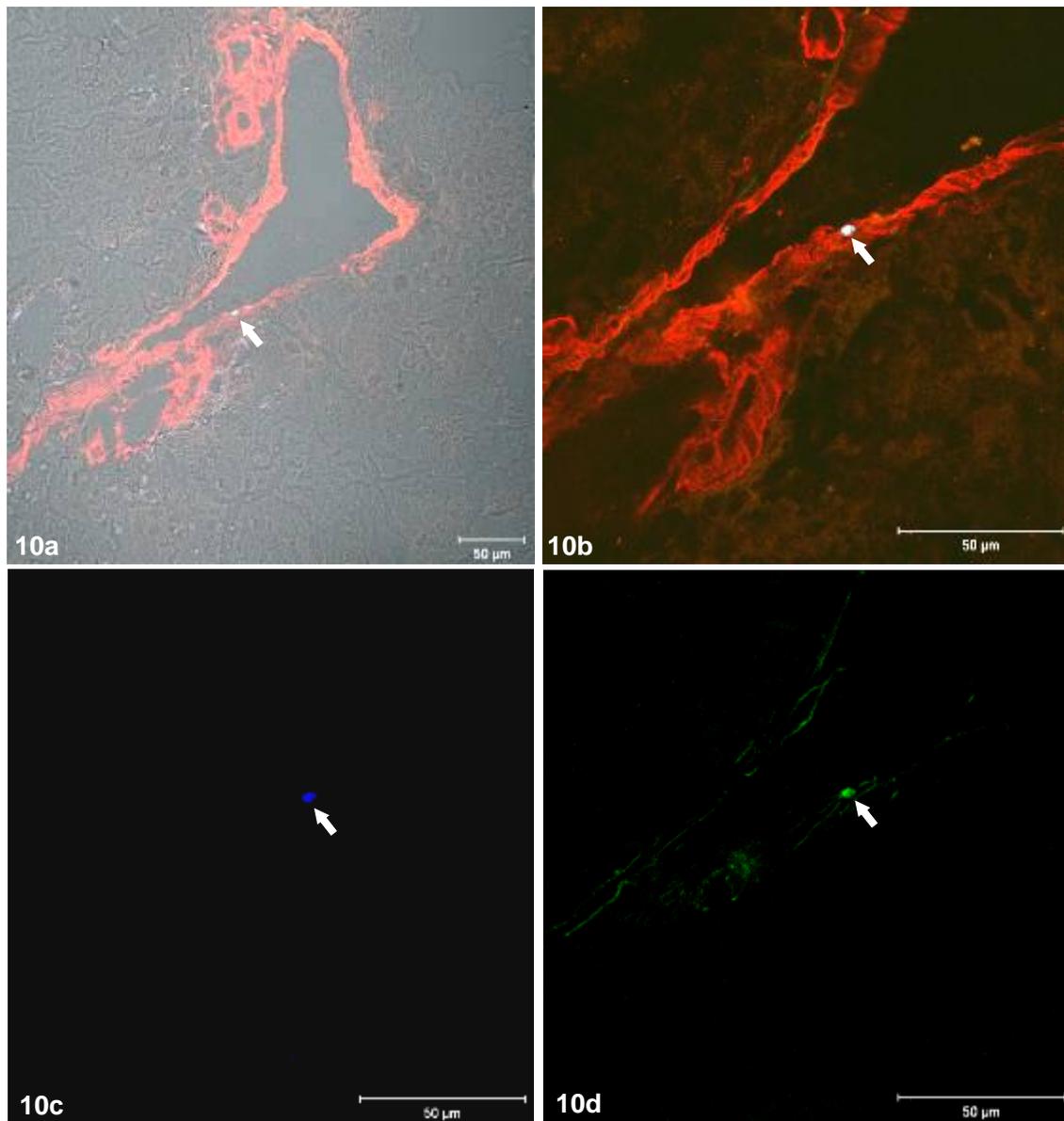


Figura 10: Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 15 minutos**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpos primários anti-CD34 e anti-laminina, e anticorpos secundários conjugados com FITC (verde) e TRITC (vermelho), respectivamente. **(10a)** Sobreposição das imagens de contraste interferencial diferencial (DIC) e de fluorescência (DAPI, CD34-FITC e laminina-TRITC). A laminina está presente nos vasos hepáticos, como na veia porta. A célula (seta) apresenta co-localização do DAPI e do marcador de célula-tronco hematopoiética CD34, e está aderida na parede do vaso expressando laminina. Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(10b)** Sobreposição das imagens de fluorescência em maior aumento (63x; Barra = 50 µm). **(10c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI (seta) (63x; Barra = 50 µm). **(10d)** Célula-tronco hematopoiética de medula óssea expressando o marcador CD34 (seta) (63x; Barra = 50 µm).

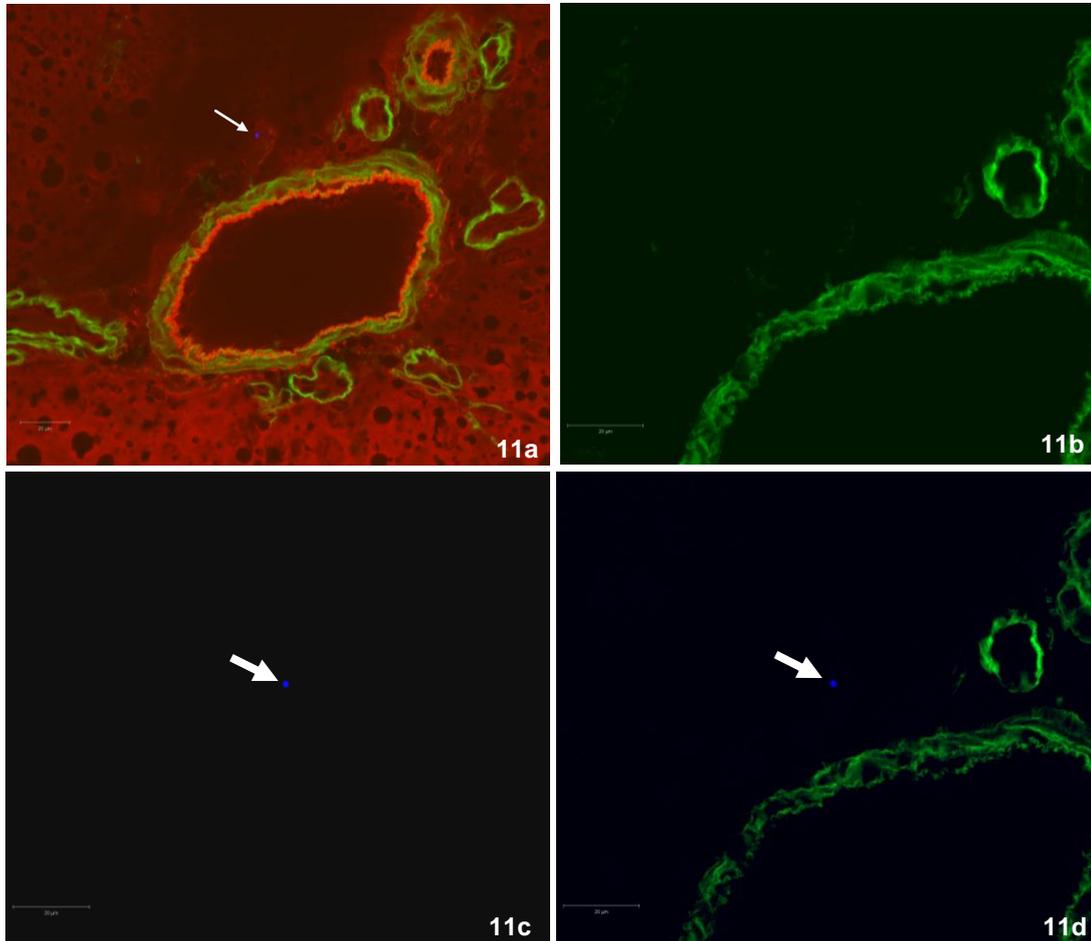


Figura 11: Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 1 dia**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). A seta indica uma célula de medula óssea próxima a um vaso do espaço porta expressando laminina **(11a)** Sobreposição das imagens de fluorescência: DAPI (seta), laminina e Azul de Evans. Aumento de 40x. Barra = 20 µm. **(11b)** Imunomarcção para laminina em maior aumento (63x; Barra = 20 µm). **(11c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI (63x; Barra = 20 µm). **(11d)** Sobreposição das imagens 11b (laminina-FITC) e 11c (DAPI). (63x; Barra = 20 µm).

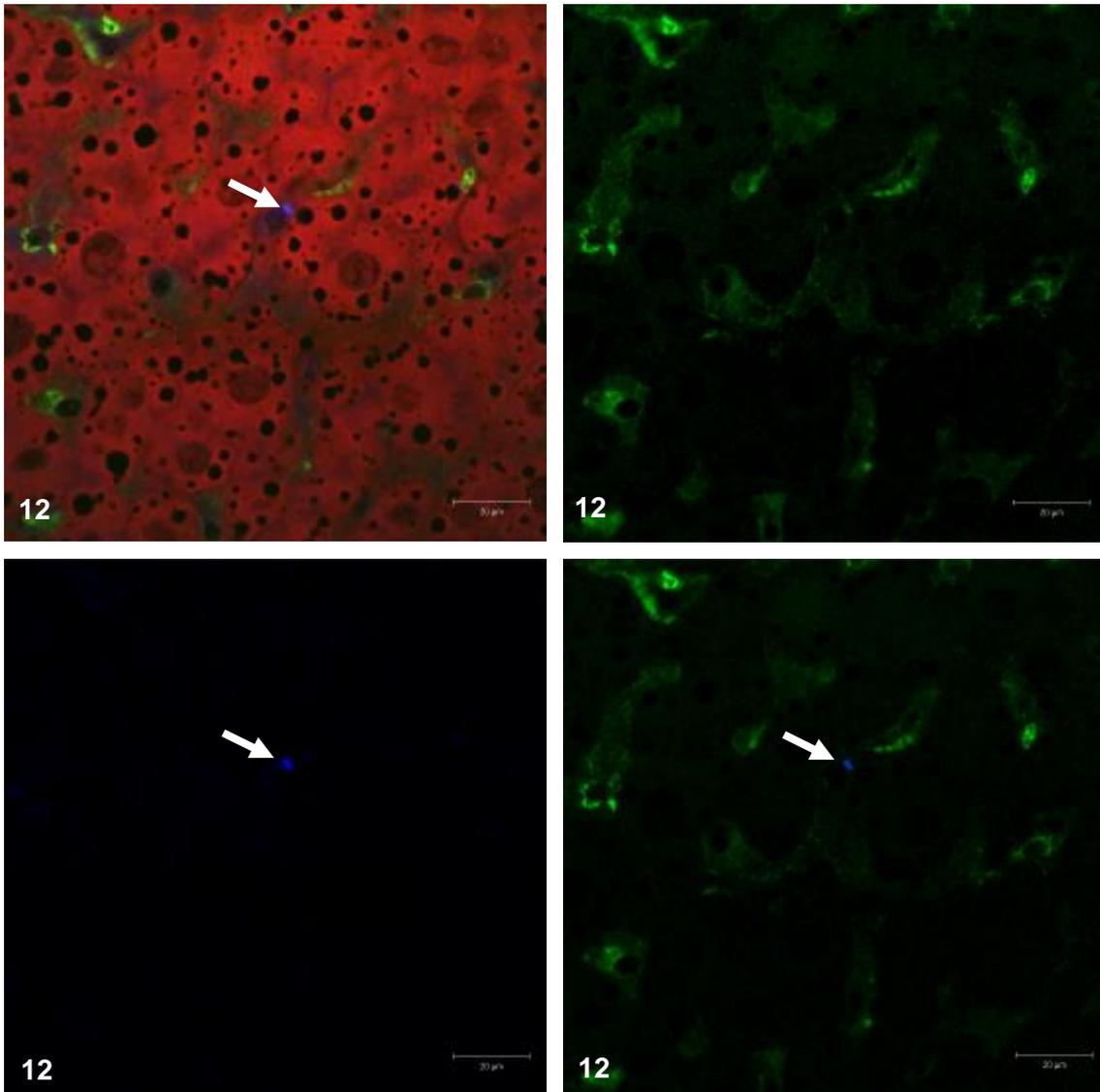


Figura 12: Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 1 dia**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(12a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea no sinusóide hepático expressando laminina. **(12b)** Imunomarcção para laminina. **(12c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(12d)** Sobreposição das imagens 12b (laminina-FITC) e 12c (DAPI).

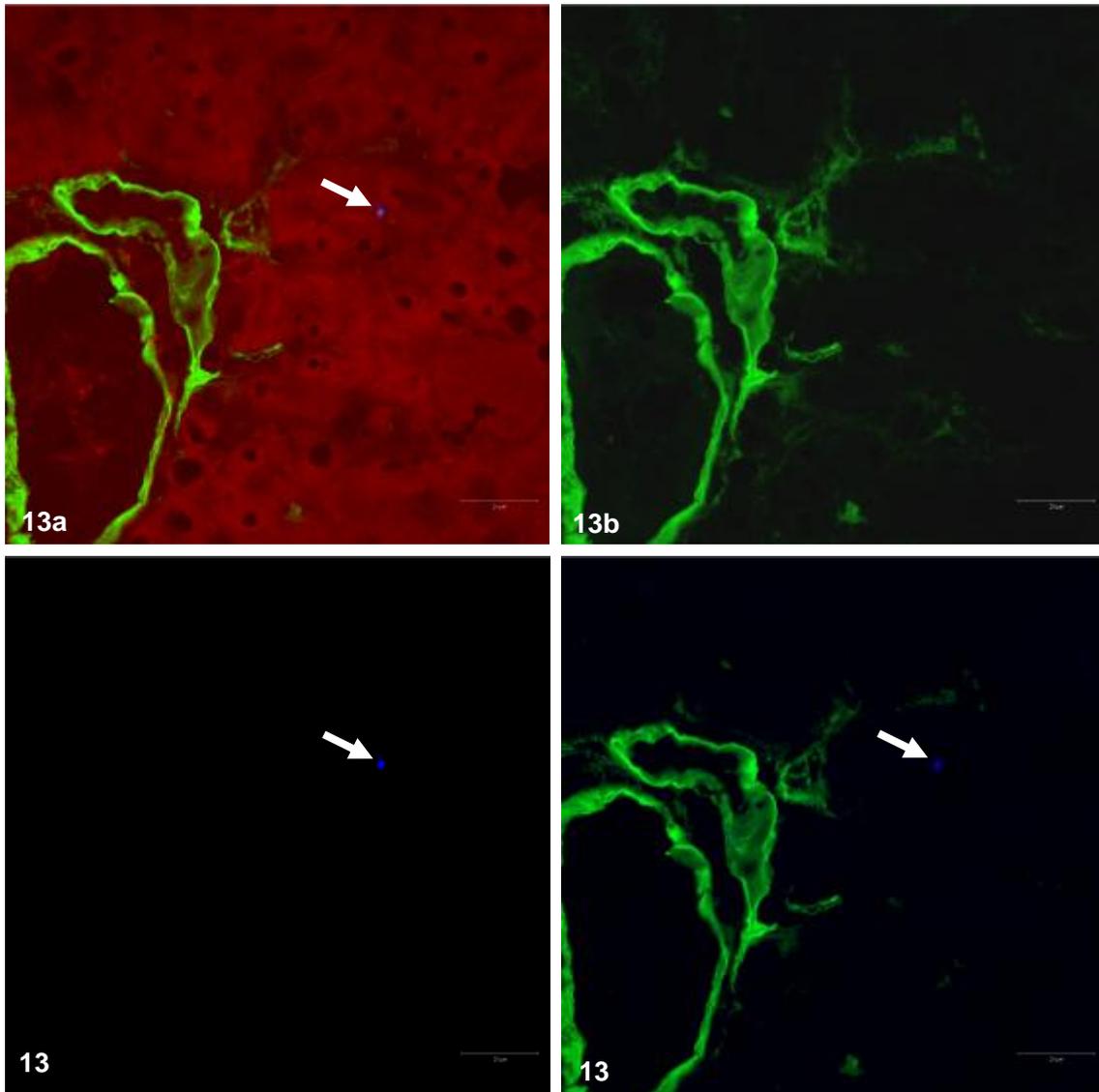


Figura 13: Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 1 dia**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20  $\mu$ m. **(13a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea próxima a um espaço porta expressando laminina. A laminina também aparece nos sinusóides hepáticos. **(13b)** Imunomarcção para laminina. **(13c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(13d)** Sobreposição das imagens 13b (laminina-FITC) e 13c (DAPI).

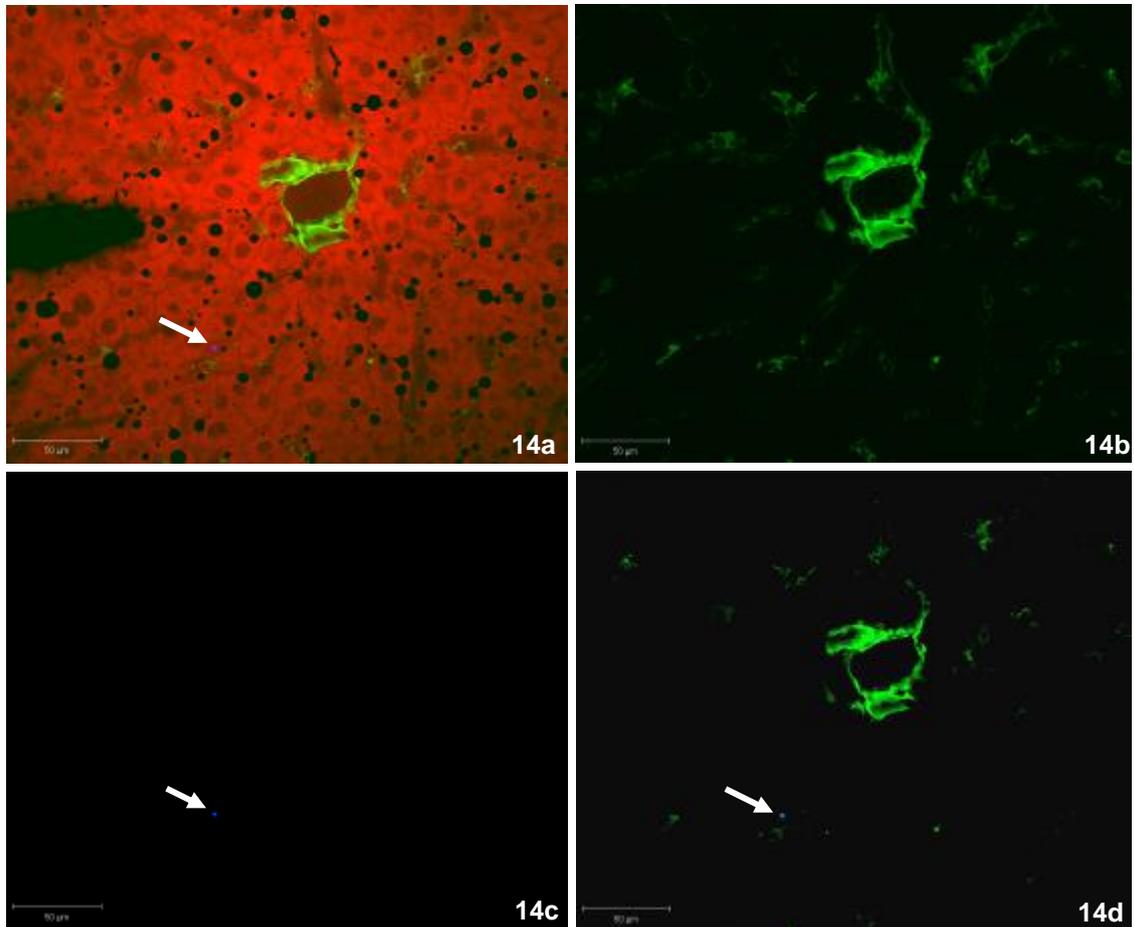
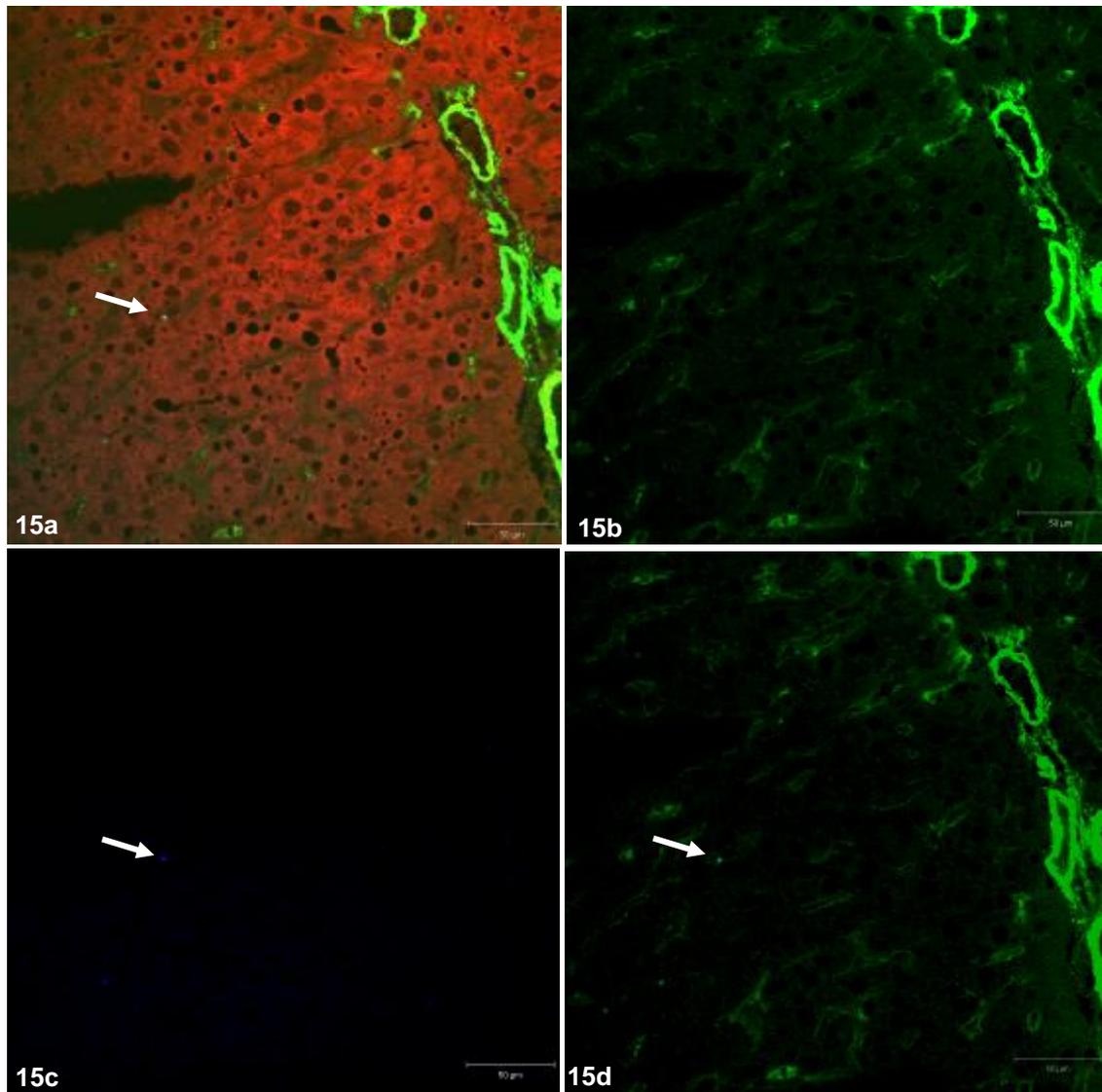
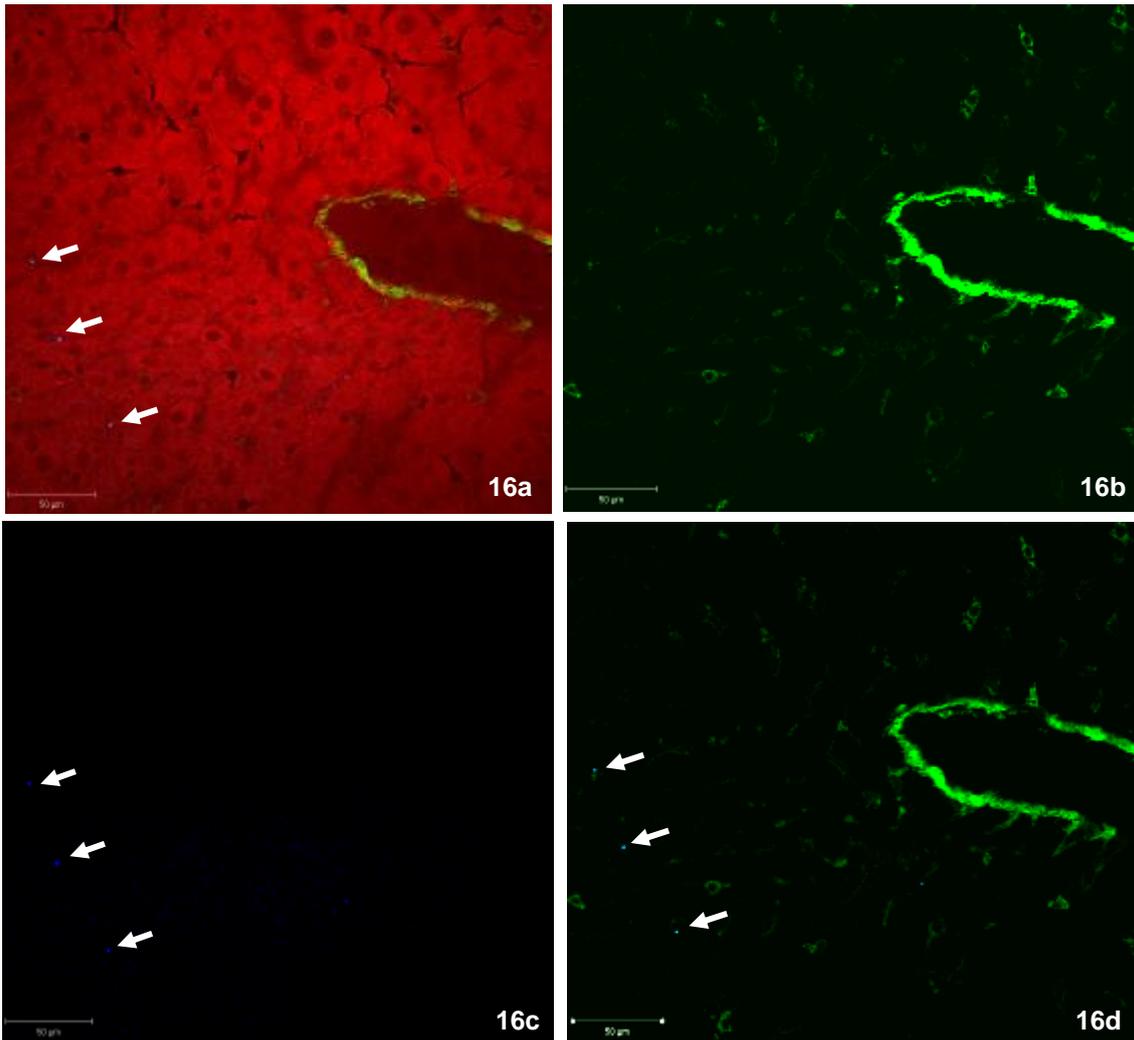


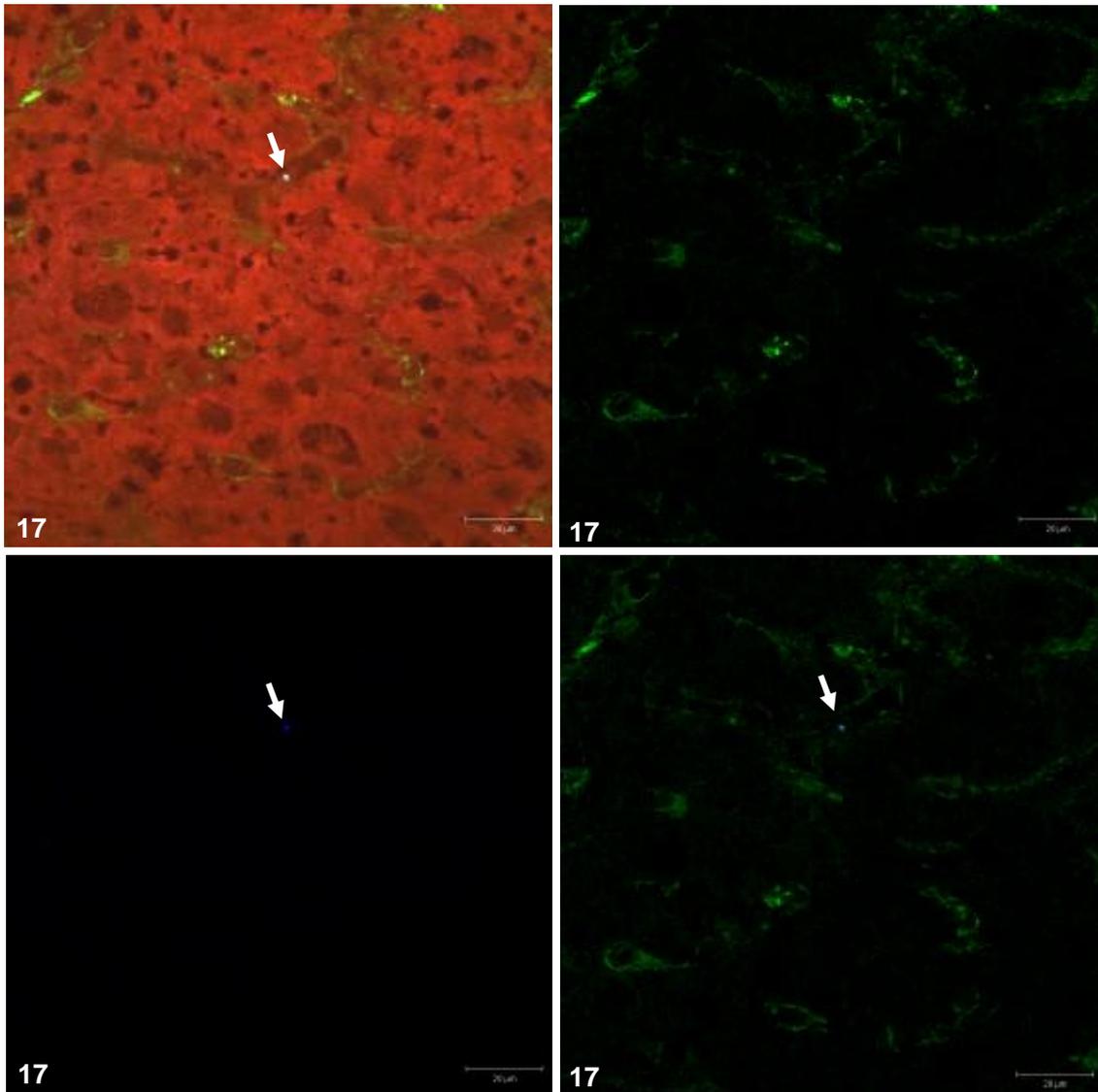
Figura 14: Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 3 dias**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50 µm. **(14a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea no parênquima hepático, próxima a um espaço porta expressando laminina. A expressão de laminina também ocorre nos sinusóides hepáticos. **(14b)** Imunomarcção para laminina. **(14c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(14d)** Sobreposição das imagens 14b (laminina-FITC) e 14c (DAPI).



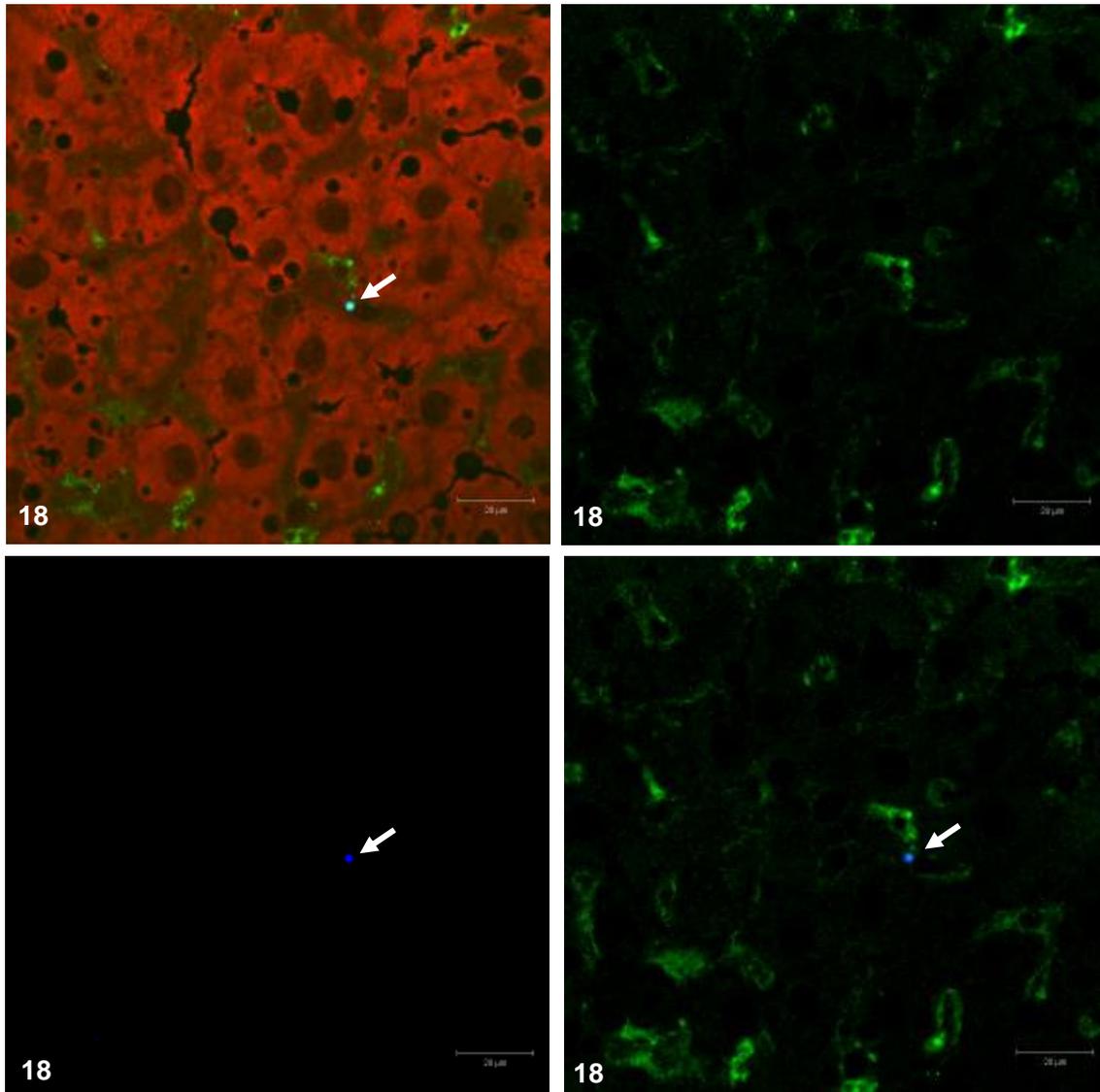
**Figura 15:** Microscopia confocal de fígado de **rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea** previamente marcadas com DAPI (azul). **Após 3 dias**, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . **(15a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea no sinusóide hepático expressando laminina, próxima a um espaço porta. **(15b)** Imunomarcção para laminina. **(15c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(15d)** Sobreposição das imagens 15b (laminina-FITC) e 15c (DAPI).



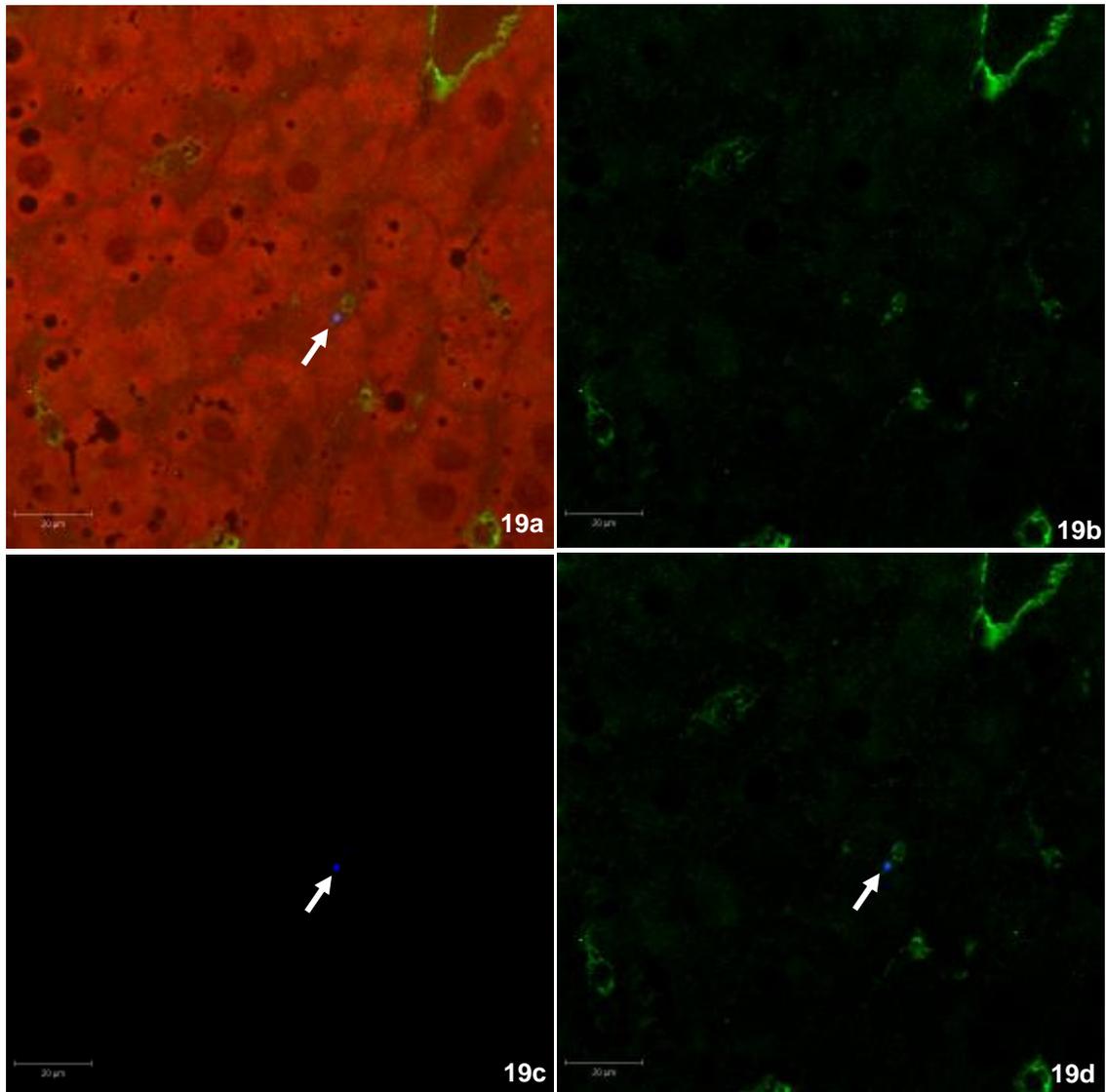
**Figura 16:** Microscopia confocal de fígado de rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea previamente marcadas com DAPI (azul). Após 3 dias, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 40x. Barra = 50  $\mu$ m. **(16a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). As setas indicam células de medula óssea próximas aos sinusóides hepáticos e à veia centrolobular expressando laminina. **(16b)** Imunomarcagem para laminina. **(16c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(16d)** Sobreposição das imagens 16b (laminina-FITC) e 16c (DAPI).



**Figura 17:** Microscopia confocal de fígado de rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea previamente marcadas com DAPI (azul). Após 3 dias, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(17a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea nos sinusóides hepáticos expressando laminina. **(17b)** Imunomarcagem para laminina. **(17c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(17d)** Sobreposição das imagens 17b (laminina-FITC) e 17c (DAPI).



**Figura 18:** Microscopia confocal de fígado de rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea previamente marcadas com DAPI (azul). Após 3 dias, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(18a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea nos sinusóides hepáticos expressando laminina. **(18b)** Imunomarcagem para laminina. **(18c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(18d)** Sobreposição das imagens 18b (laminina-FITC) e 18c (DAPI).



**Figura 19:** Microscopia confocal de fígado de rato hepatectomizado e imediatamente transplantado com células de medula óssea previamente marcadas com DAPI (azul). Após 3 dias, o fígado foi coletado e imunomarcado com anticorpo primário anti-laminina (FITC) e corante Azul de Evans (hepatócitos em vermelho). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(19a)** Sobreposição das imagens de fluorescência (DAPI, laminina e Azul de Evans). A seta indica uma célula de medula óssea nos sinusóides hepáticos expressando laminina. **(19b)** Imunomarcção para laminina. **(19c)** Núcleo da célula de medula óssea marcado com DAPI. **(19d)** Sobreposição das imagens 19b (laminina-FITC) e 19c (DAPI).

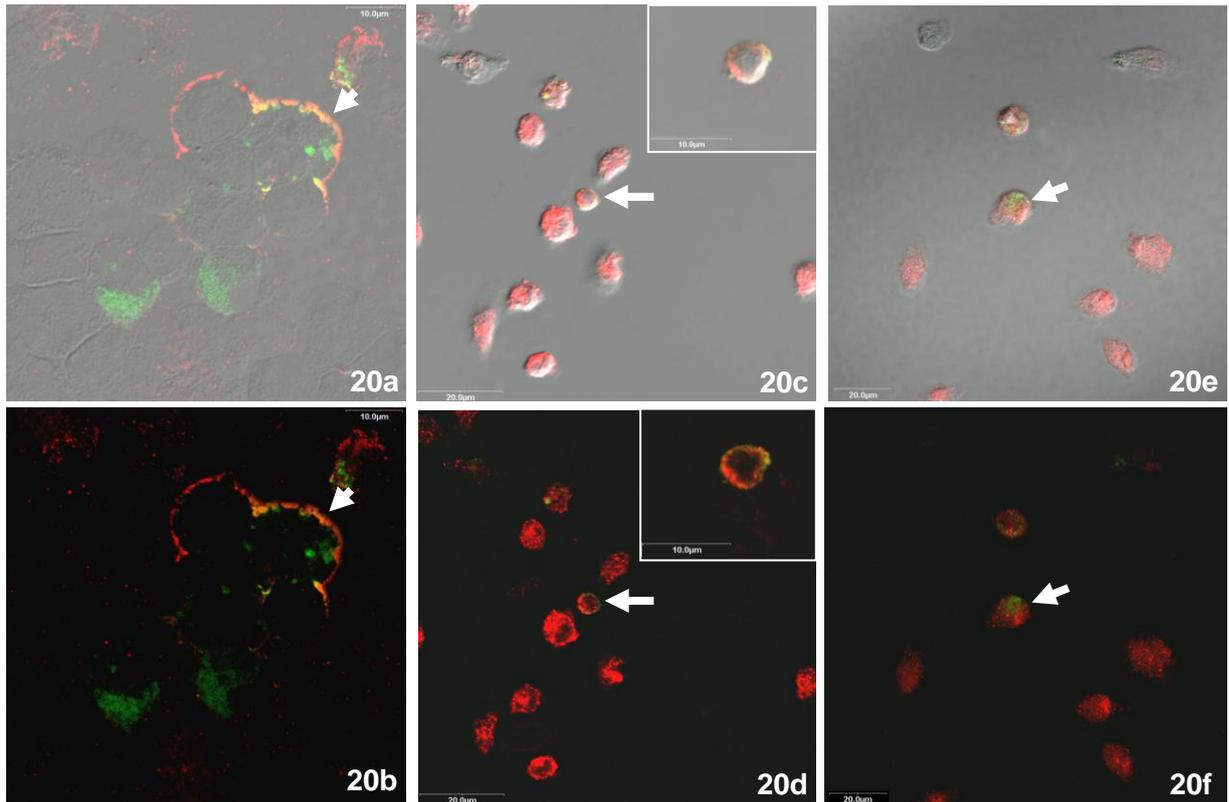
### **9.3 Análise da expressão de osteopontina (OPN) em células de medula óssea e células-tronco hematopoiéticas (CTHs)**

A imunomarcção de células mononucleares de medula óssea recém-isoladas mostrou que um grande número dessas células expressa quantidades variáveis de OPN. A dupla-marcação com OPN-Cy3 e CD34-FITC demonstrou que algumas células-tronco hematopoiéticas também expressam OPN (Figuras 20a e 20b).

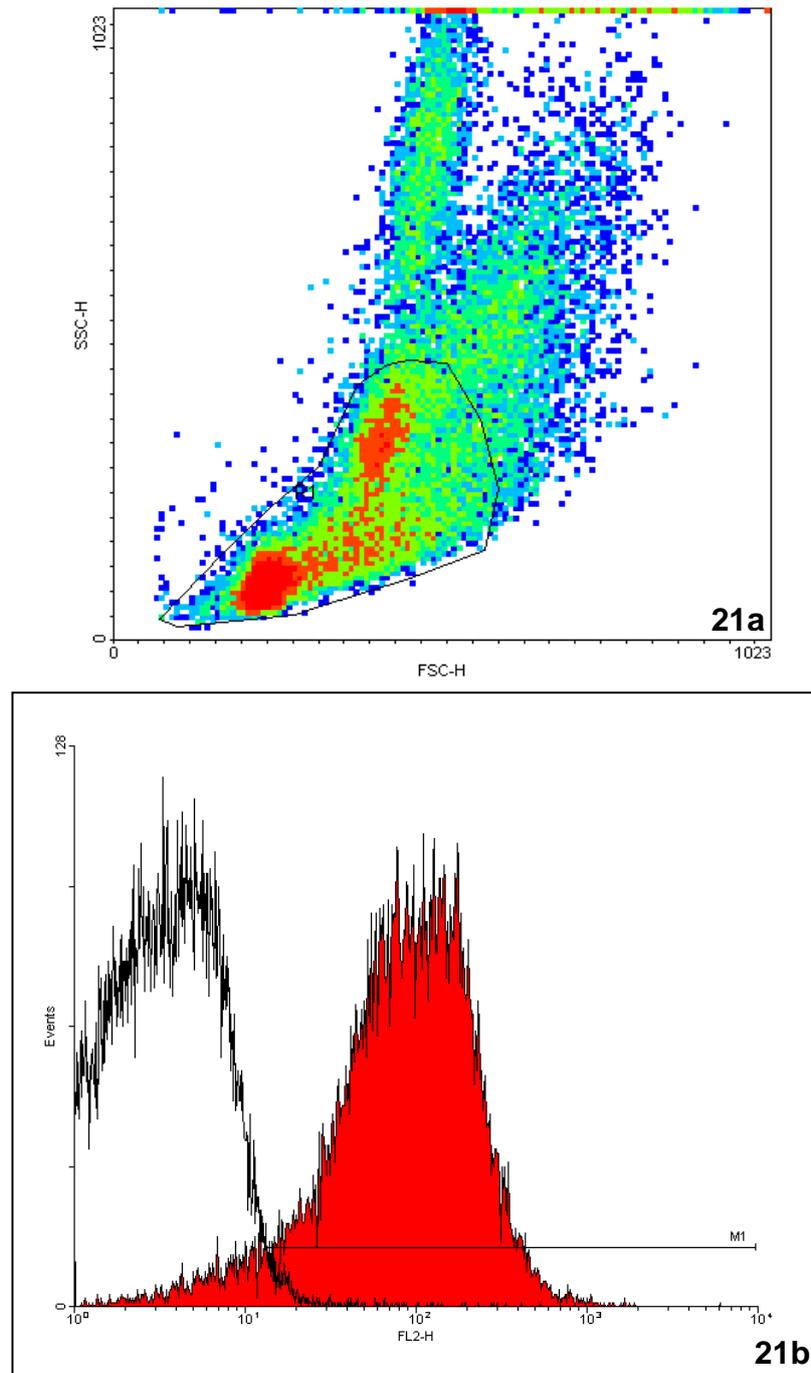
Após 1 e 4 dias de cultura, observamos que ocorre uma diminuição de células expressando CD34, e um aumento na expressão de OPN pelas células mononucleares de medula óssea (Figuras 20c a 20f).

### **9.4 Citometria de Fluxo para OPN de células mononucleares da medula óssea**

A análise dos dados obtidos por citometria de fluxo das células mononucleares de medula óssea imunomarcadas para a proteína OPN mostrou que cerca de 90% dessas células apresentam quantidades variáveis de OPN ( $p = 0,0005$ ;  $S = 2,061$ ) (Figura 21).



**Figura 20:** Microscópio confocal de fluorescência. **Células mononucleares de medula óssea** duplamente marcadas com CD34 (FITC-verde) e OPN (Cy3 – vermelho). **(20a)** Cytospin de células recém isoladas. Sobreposição das imagens de fluorescência e DIC. As células de medula óssea expressam OPN em quantidades variáveis. Algumas células-tronco hematopoiéticas CD34+ expressam OPN (seta). Aumento de 100x. Barra = 10 µm. **(20b)** Sobreposição das imagens de fluorescência de 20a. Aumento de 100x. Barra=10 µm. **(20c)** cultura de células mononucleares de medula óssea **após 1 dia**. Sobreposição das imagens de fluorescência e DIC. A expressão de OPN em células mononucleares de medula óssea aumenta em cultura. Algumas células-tronco hematopoiéticas CD34+ expressam OPN (seta). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. O inset mostra a célula-tronco hematopoiética expressando OPN em maior aumento. Sobreposição das imagens de fluorescência e DIC. Aumento de 100x. Barra = 10 µm **(20d)** Sobreposição das imagens de fluorescência de 20c. Aumento de 63x. Barra = 20 µm. Inset: aumento de 100x. Barra = 10 µm. **(20e)** cultura de células mononucleares de medula óssea **após 4 dias**. Sobreposição das imagens de fluorescência e DIC. As células mononucleares de medula óssea expressam OPN em quantidades variáveis em cultura. Algumas células-tronco hematopoiéticas CD34+ expressam OPN (seta). Aumento de 63x. Barra = 20 µm. **(20f)** Sobreposição das imagens de fluorescência de 20e. Aumento de 63x. Barra = 20 µm.



**Figura 21:** Análise por citometria de fluxo das células mononucleares de medula óssea imunomarcadas para OPN utilizando o programa WinMDI 2.9. Cerca de 90% dessas células apresentam OPN em quantidades variáveis. **(21a)** Gráfico de densidade celular mostrando o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células isoladas, com a seleção das células com características de mononucleares. **(21b)** Histograma mostrando a marcação com anticorpo primário anti-OPN e com anticorpo secundário Cy3 (área vermelha) e o controle utilizando somente o anticorpo secundário Cy3 (área branca).

## 10 DISCUSSÃO

A análise por microscopia confocal da expressão de laminina no fígado de ratos após a hepatectomia parcial demonstrou que, com 15 minutos, os vasos do espaço porta e a veia centrolobular expressam laminina em quantidade, enquanto que após 1 e 3 dias a expressão de laminina passa a ocorrer também nos capilares sinusóides hepáticos. Esses dados estão de acordo com Wack et al. (2001), que sugerem que a laminina pode estar envolvida na migração das células endoteliais para as áreas onde os hepatócitos estão proliferando em resposta a hepatectomia. Além disso, observamos hepatócitos binucleados e vasos e ductos do espaço porta com muitos ramos, ambos indicando a intensa proliferação das células hepáticas, já descrito anteriormente nesse modelo de lesão (Michalopoulos 2007).

Pela primeira vez, nós demonstramos por microscopia confocal, que após o transplante de células mononucleares de medula óssea previamente marcadas com DAPI em animais hepatectomizados, as células-tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> encontram-se aderidas aos ramos da veia porta, os quais expressam laminina. Conforme já está descrito na literatura (Omori *et al.* 1997), também observamos uma expressão tênue de CD34 no endotélio do espaço porta.

As lamininas são uma família de proteínas de matriz extracelular heterotriméricas, com funções adesivas e quimiotáticas pelo recrutamento de integrinas e outros receptores de superfície celular (LeBleu *et al.* 2007). Foi demonstrado que as CTHs e outras células da medula óssea apresentam na membrana ligantes para lamininas envolvidos com a regulação do comportamento celular (Sagar *et al.* 2006). Assim, sugerimos que a laminina pode participar da adesão inicial das células de medula óssea após o transplante em fígados sob lesão, contribuindo para o processo de regeneração hepática promovido por essas células. Além disso, 1 dia e 3 dias após a hepatectomia, nossos resultados demonstraram também a presença de células de medula óssea marcadas com DAPI distribuídas nos capilares sinusóides, os quais também expressavam laminina, sugerindo um papel importante dessa proteína na adesão e migração de células de medula óssea pelo tecido hepático em regeneração.

Com base nos resultados descritos acima, nós sugerimos que a laminina pode participar da regeneração hepática após o transplante de células de medula óssea em dois momentos consecutivos: (1<sup>o</sup>) nos minutos iniciais, permitindo a

adesão dessas células aos vasos hepáticos e a sua migração para o fígado lesionado, evitando que essas células se percam na circulação sanguínea e migrem para outros órgãos; e (2º) após 1 e 3 dias, promovendo a distribuição das células de medula óssea pelo parênquima hepático, onde poderão atuar localmente exercendo um efeito parácrino (secretando fatores e citocinas pró-mitóticos e pró-sobrevivência das células hepáticas) ou se diferenciando em precursores endoteliais para formação de capilares sinusóides, como também sugerido por Thorgeirsson e Grisham (2006).

Já está bem estabelecido que as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) adultas de medula óssea interagem com inúmeros tipos celulares e moléculas de matriz extracelular constituindo o nicho hematopoiético. O osteoblasto é uma célula importante para esse nicho, e secreta, entre outras moléculas, a OPN, responsável por inibir a proliferação das CTHs e manter seu número estável na medula óssea. A OPN se liga a integrinas  $\beta_8$  nas CTHs, as quais podem ativar cascatas de sinalização intracelular envolvidas com a manutenção da quiescência dessas CTHs (Nilsson *et al.* 2005, Haylock e Nilsson 2006).

Nossos resultados por microscopia confocal e citometria de fluxo demonstraram que a maioria das células mononucleares da medula óssea expressa OPN em quantidades variáveis. Essa expressão de OPN aumentou *in vitro*, na presença de componentes de soro no meio de cultura, como fatores de crescimento. Além disso, a análise por microscopia confocal demonstrou que algumas CTHs CD34<sup>+</sup> também expressam OPN. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores (Nilsson *et al.* 2005, Haylock e Nilsson 2006), que mostraram que na medula óssea a OPN pode se ligar a receptores presentes na membrana das células hematopoiéticas.

Portanto, nós sugerimos que a OPN pode ser expressa no citoplasma das células mononucleares de medula óssea e das CTHs, e essa proteína pode estar relacionada com um estágio mais tardio de diferenciação celular em relação às CTHs primitivas ou estar aderida a receptores de superfície celular, uma vez que a OPN é um dos principais componentes da matriz extracelular da medula óssea hematopoiética.

## 11 CONCLUSÃO

- 1- A expressão de laminina aumenta nos 3 primeiros dias após a hepatectomia, sendo observada nos vasos do espaço porta, veia centrolobular e nos capilares sinusóides hepáticos.
- 2- Nos minutos iniciais após a hepatectomia seguida do transplante de células mononucleares de medula óssea, a célula-tronco hematopoiética recém-transplantada está em proximidade com a laminina presente na veia porta.
- 3- Nos 3 primeiros dias após a hepatectomia, as células mononucleares de medula óssea transplantadas são observadas em proximidade com a laminina expressa pelos capilares sinusóides hepáticos.
- 4- A osteopontina está presente em quantidades variáveis em grande parte das células mononucleares de medula óssea.
- 5- Algumas células-tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> de medula óssea expressam osteopontina.

## REFERÊNCIAS

- Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM: Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899.
- Adams GB, Scadden DT: The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 2006; 7: 333-337.
- Arai F, Suda T: Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Adv Exp Med Biol* 2007; 602: 61-67.
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B: Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56: 405-415.
- Austin TW, Lagasse E: Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 2003; 120: 131-135.
- Bellantuono I: Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 607-620.
- Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J: Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6: 32-40.
- Blank U, Karlsson G, Karlsson S: Signaling pathways governing stem cell fate. *Blood* 2007.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M: Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44: 215-230.
- Corcelle V, Stieger B, Gjinovci A, Wollheim CB, Gauthier BR: Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2826-2836.
- Coulombel L: Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 2004; 23: 7210-7222.
- Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN: Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *Faseb J* 2005; 19: 1225-1231.
- Denhardt DT, Guo X: Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J* 1993; 7: 1475-1482.
- Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M: Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 21-38.

- Fausto N: Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
- Fausto N, Campbell JS: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003; 120: 117-130.
- \_\_\_\_\_. Riehle KJ: Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-53.
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y: Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002; 36: 653-659.
- Gartner LP, Hiatt JL: Tratado de Histologia. 2007; 3ª Ed.: 431.
- Gu YC, Kortessmaa J, Tryggvason K, Persson J, Ekblom P, Jacobsen SE, Ekblom M: Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood* 2003; 101: 877-885.
- Haylock DN, Nilsson SK: Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol* 2006; 134: 467-474.
- Hortelano S, Zeini M, Casado M, Martin-Sanz P, Bosca L: Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci* 2007; 12: 13-21.
- Huang X, Cho S, Spangrude GJ: Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1851-1859.
- Iredale JP: Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117: 539-548.
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ: Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539.
- Junqueira LC, Carneiro J: Histologia Básica. 2004; 10ª Ed.: 239-243.
- Kar K, Amin P, Bryan MA, Persikov AV, Mohs A, Wang YH, Brodsky B: Self-association of collagen triple helix peptides into higher order structures. *J Biol Chem* 2006; 281: 33283-33290.
- Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT: Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* 2007; 102: 912-924.
- Khurana S, Mukhopadhyay A: Characterization of the potential subpopulation of bone marrow cells involved in the repair of injured liver tissue. *Stem Cells* 2007; 25: 1439-1447.
- Kikkawa Y, Mochizuki Y, Miner JH, Mitaka T: Transient expression of laminin alpha1 chain in regenerating murine liver: restricted localization of laminin chains and nidogen-1. *Exp Cell Res* 2005; 305: 99-109.
- Kmiec Z: Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001; 161: III-XIII, 1-151.

- Kolf CM, Cho E, Tuan RS: Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 204.
- Konig S, Krause P, Markus PM, Becker H: [Role of stem cells in adult hepatic regeneration]. *Chirurg* 2005; 76: 445-452.
- Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC: A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity. *Blood* 2005; 106: 1574-1580.
- Kumaran V, Joseph B, Benten D, Gupta S: Integrin and extracellular matrix interactions regulate engraftment of transplanted hepatocytes in the rat liver. *Gastroenterology* 2005; 129: 1643-1653.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
- LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R: Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 1121-1129.
- Levicar N, Dimarakis I, Flores C, Tracey J, Gordon MY, Habib NA: Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 2007: 243-262.
- Lorena D, Darby IA, Gadeau AP, Leen LL, Rittling S, Porto LC, Rosenbaum J, Desmouliere A: Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *J Hepatol* 2006; 44: 383-390.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR: New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* 2005; 33: 27-34.
- Martinez-Hernandez A, Amenta PS: The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993; 423: 1-11.
- \_\_\_\_\_. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995; 9: 1401-1410.
- Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN: Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004; 22: 897-907.
- Mendez-Otero R, Valle CZ, Mello LEA, Carvalho ACC. In: *Morales M. Terapias Avançadas. Células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde*. Ed. Atheneu 2007.
- Michalopoulos GK: Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213: 286-300.
- Miner JH, Yurchenco PD: Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Daí Cell Dev Biol* 2004; 20: 255-284.
- Moore KA, Lemischka IR: Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311: 1880-1885.

- Najimi M, Sokal E: Liver cell transplantation. *Minerva Pediatr* 2005; 57: 243-257.
- Nardi NB, Alfonso ZC. In: Zago, MA e Covas, DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. Ed. Atheneu 2006.
- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, Bertocello I, Bendall LJ, Simmons PJ, Haylock DN: Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005; 106: 1232-1239.
- O'Regan A: The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Daí* 2003; 14: 479-488.
- Ogura Y, Hamanoue M, Tanabe G, Mitsue S, Yoshidome S, Nuruki K, Aikou T: Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 545-549.
- Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE: Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132: 1077-1087.
- Omori N, Omori M, Evarts RP, Teramoto T, Miller MJ, Hoang TN, Thorgeirsson SS: Partial cloning of rat CD34 Cdna and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* 1997; 26: 720-727.
- Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML: Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
- Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A: From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 2004; 199: 174-180.
- Ruhnke M, Nussler AK, Ungefroren H, Hengstler JG, Kremer B, Hoeckh W, Gottwald T, Heeckt P, Fandrich F: Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* 2005; 79: 1097-1103.
- Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ: The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130: 1807-1821.
- Sagar BM, Rentala S, Gopal PN, Sharma S, Mukhopadhyay A: Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350: 1000-1005.
- Sasaki T, Fassler R, Hohenester E: Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 2004; 164: 959-963.

Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT: Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 2005; 201: 1781-1791.

Szilvassy SJ: The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34: 446-460.

Thorgeirsson SS, Grisham JW: Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006; 43: 2-8.

Tsamandas AC, Antonacopoulou A, Kalogeropoulou C, Tsota I, Zabakis P, Giannopoulou E, Liava A, Tzelepi V, Tepetes K, Petsas T, Kardamakis D, Kalofonos HP: Oval cell proliferation in cirrhosis in rats. Daí experimental study. *Hepatol Res* 2007; 37: 755-764.

Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T: Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 595-601.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW: Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904.

Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB: Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001; 33: 363-378.

Wake K: Cell-cell organization and functions of 'sinusoids' in liver microcirculation system. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1999; 48: 89-98.

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

Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A: Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106: 64-75.

Xia JL, Daí C, Michalopoulos GK, Liu Y: Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1500-1512.

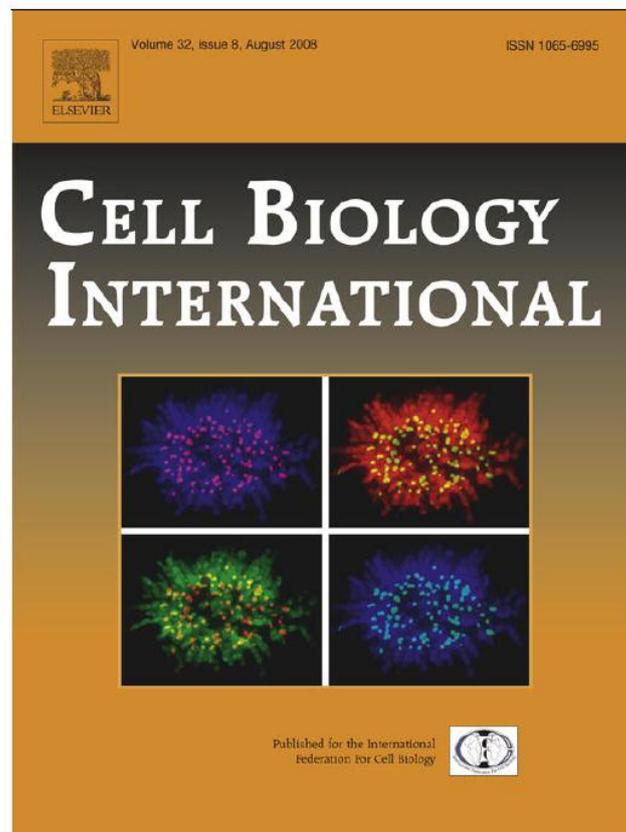
Yamamoto H, Murawaki Y, Kawasaki H: Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995; 21: 155-161.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012.

Yu Y, Yao AH, Chen N, Pu LY, Fan Y, Lv L, Sun BC, Li GQ, Wang XH: Mesenchymal Stem Cells Over-expressing Hepatocyte Growth Factor Improve Small-for-size Liver Grafts Regeneration. *Mol Ther* 2007; 15: 1382-1389.

**APÊNDICE** - Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



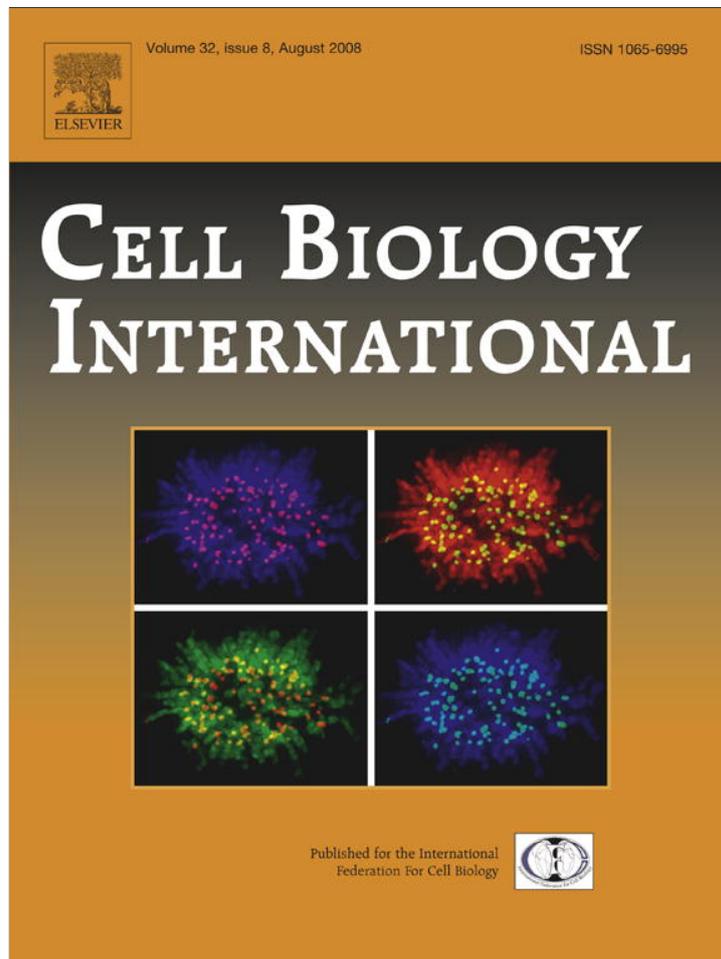
This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Short communication

## Laminin expression during bone marrow mononuclear cell transplantation in hepatectomized rats

Simone Carvalho<sup>a</sup>, Erika Cortez<sup>a</sup>, Ana Carolina Stumbo<sup>a</sup>, Alessandra Thole<sup>a</sup>,  
 Carlos Caetano<sup>b</sup>, Ruy Marques<sup>b</sup>, Marcelo Pelajo-Machado<sup>c</sup>,  
 Luis Cristóvão Porto<sup>a</sup>, Laís Carvalho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório Cultura de Células, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 3º andar, 20550-170 Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratório de Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, UERJ, Brazil*

<sup>c</sup> *Depto de Patologia, IOC, Fiocruz, RJ, Brazil*

Received 19 December 2007; revised 8 January 2008; accepted 2 April 2008

### Abstract

The adult bone marrow retains two populations of stem cells with emerging importance for the treatment of diverse liver diseases: hematopoietic stem cells (HSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs). However, the mechanisms that control liver regeneration after bone marrow cell transplantation are still controversial. Liver regeneration after partial hepatectomy is a complex process that requires the proliferation of all hepatic cells. Growth factors, cytokines and extracellular matrix molecules are key elements in this process. Laminins are a family of extracellular matrix proteins with adhesive and chemotactic functions, expressed in the portal and centrolobular veins of the normal liver. The aim of this study was to investigate laminin expression during liver regeneration induced by partial hepatectomy followed by bone marrow mononuclear cell (BMMNC) transplantation. Rat BMMNCs were isolated by Ficoll-gradient centrifugation, stained with DAPI and injected into recently hepatectomized rats via the portal vein. Liver sections obtained 15 min, 1 day and 3 days after the surgery were immunolabeled with anti-rat CD34 and/or laminin primary antibodies and observed under a laser scanning confocal microscope. Results showed that 15 min after partial hepatectomy, a transplanted CD34<sup>+</sup> HSC was found in contact with laminin, which was localized in the portal and centrolobular veins of rat livers. Furthermore, 1 and 3 days after hepatectomy, transplanted BMMNCs were found in the hepatic sinusoids expressing laminin. These results strongly suggest that laminin might be an important extracellular matrix component for bone marrow cell attachment and migration in the injured liver.

© 2008 Published by Elsevier Ltd on behalf of International Federation for Cell Biology.

*Keywords:* Bone marrow mononuclear cells; Hematopoietic stem cells; Hepatectomy; Laminin

### 1. Introduction

Bone marrow cell therapy has emerged as a promising approach to treat many diseases which lack efficient pharmacological treatment, and to avoid the complications of organ transplantation. In this respect, the mononuclear fraction of the bone marrow contains two populations of stem cells – hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stem cells

(MSCs) – that are thought to participate in regenerative processes (Abdel Aziz et al., 2007; Thorgeirsson and Grisham, 2006).

Many studies have shown the application of bone marrow cells, or purified bone marrow stem cells of hematopoietic or mesenchymal origin, in animal models of liver diseases such as fibrosis, cirrhosis and metabolic alterations, has for liver function. However, the exact mechanism of how these cells contribute to hepatic regeneration has been discussed. It is well established that, under certain conditions, MSCs can differentiate into functional hepatocytes, although this

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 25876125.  
 E-mail address: ldc29@globo.com (L. Carvalho).

phenomenon is considered rare and limited for HSCs (Abdel Aziz et al., 2007; Yu et al., 2007; Kuhlmann and Peschke, 2006; Thorgeirsson and Grisham, 2006). The loss of hepatic tissue due to resection, or partial hepatectomy, triggers a mitotic wave in all hepatic cells, and the liver can regenerate its original mass without any detectable morphological or functional alteration.

Laminins are a family of heterotrimeric extracellular matrix proteins with adhesive and chemotactic functions through recruitment of integrins and other cell surface receptors, implicated in important biological processes such as cell migration and differentiation (Sasaki et al., 2004). In the normal liver, laminin is expressed around the portal vessels and centrolobular veins; however, 3 days after hepatectomy, laminin

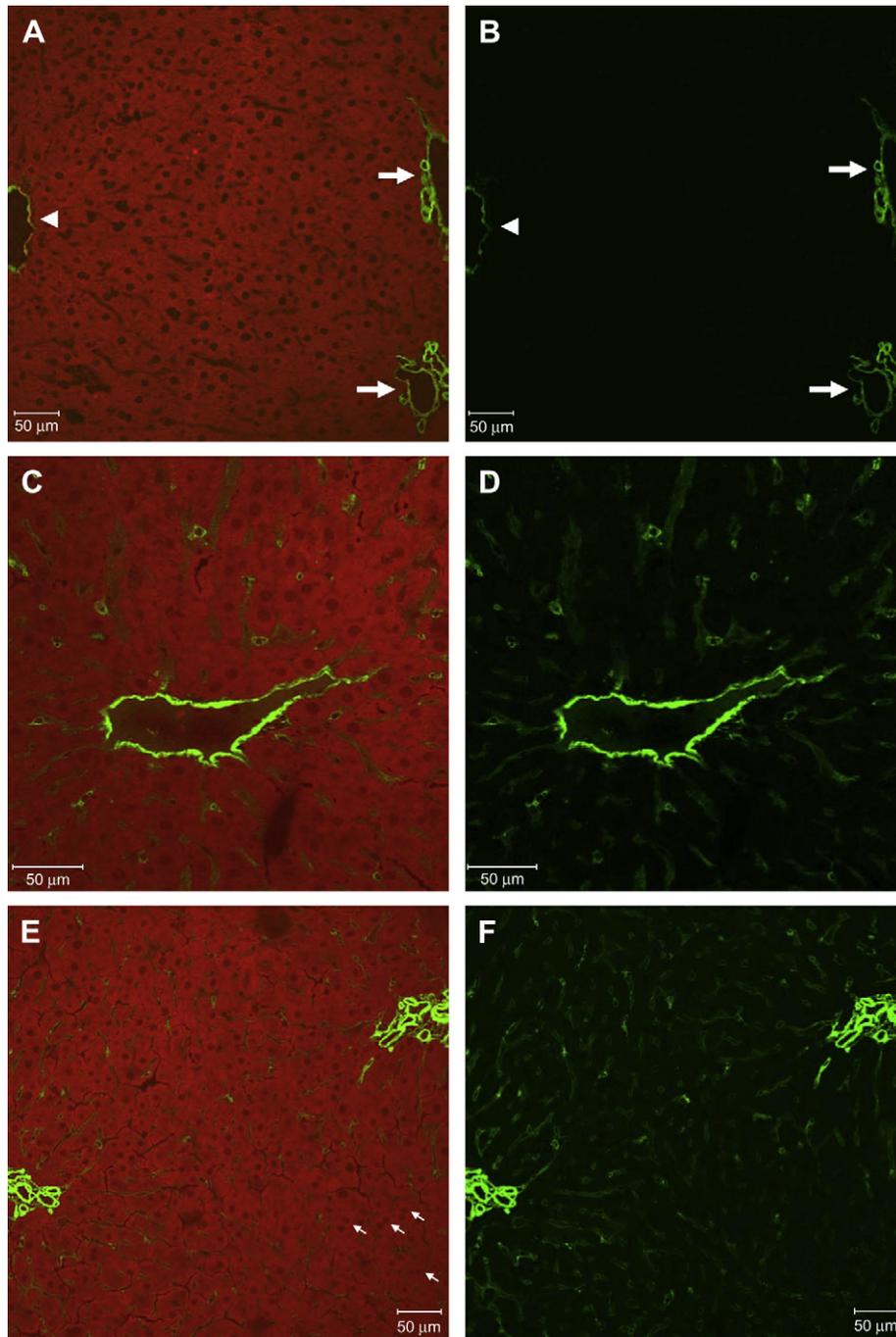


Fig. 1. Confocal laser scanning microscopy of liver sections obtained after partial hepatectomy in rats. Immunofluorescence using anti-laminin primary antibody and FITC-conjugated secondary antibody, followed by Evans blue staining. (A, C, E) Overlay of FITC (laminin) and Evans blue images. (B, D, F) Laminin immunolabeling. (A, B) Fifteen minutes after hepatectomy, portal spaces (arrows) and centrolobular veins (arrowheads) present a marked laminin expression, which is negative in the hepatic parenchyma (40 $\times$ , bar = 50  $\mu$ m). (C, D) One day after hepatectomy, laminin expression is detectable in the sinusoids of the hepatic parenchyma, besides the labeling in centrolobular veins (63 $\times$ , bar = 20  $\mu$ m). (E, F) Three days after hepatectomy, laminin expression is present in the hepatic sinusoids and in portal spaces. The arrows indicate proliferating binucleated hepatocytes (40 $\times$ , bar = 50  $\mu$ m).

expression increases in those vessels and also appears in the hepatic parenchyma, lining the sinusoids and probably participating in the migration of the proliferating endothelial cells to the clusters of newly formed hepatocytes (Wack et al., 2001).

We have investigated the early adhesion of bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) to laminin during liver regeneration after partial hepatectomy in rats.

## 2. Materials and methods

Bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) were isolated from the tibias and femurs of two-month old male Wistar rats, sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber. The medullary cavities of the bones were exposed and flushed with cold DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma–Aldrich) pH 7.2. The bone marrow cells were submitted to a Ficoll-Hypaque (Sigma–Aldrich) density gradient. After centrifugation at 2000 rpm, the mononuclear cells interface was collected and extensively washed. The cells were then incubated with the

nuclear dye DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma–Aldrich) at 5 µg/mL in DMEM for 30 min at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in air.

Three-month old male Wistar rats (250–270 g) were partially hepatectomized under halotan inhalation anesthesia and divided into six groups ( $n=5$ ). The three control groups – 15 min, 1 day and 3 day – were sacrificed after the surgery in CO<sub>2</sub> chamber. The three experimental groups were previously hepatectomized followed by transplantation with  $1 \times 10^7$  BMMNCs injected in the portal vein and sacrificed after 15 min, 1 day and 3 days. Liver samples were collected at the designated time points and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissue was maintained at –70 °C until sectioning at 5 µm. Liver sections were fixed in acetone, washed and incubated overnight with monoclonal mouse anti-rat CD34 (Santa Cruz) and polyclonal rabbit anti-rat laminin (Sigma–Aldrich) primary antibodies, followed by incubation with anti-mouse FITC-conjugated and anti-rabbit TRITC-conjugated secondary antibodies (double immunostaining for 15 min experimental

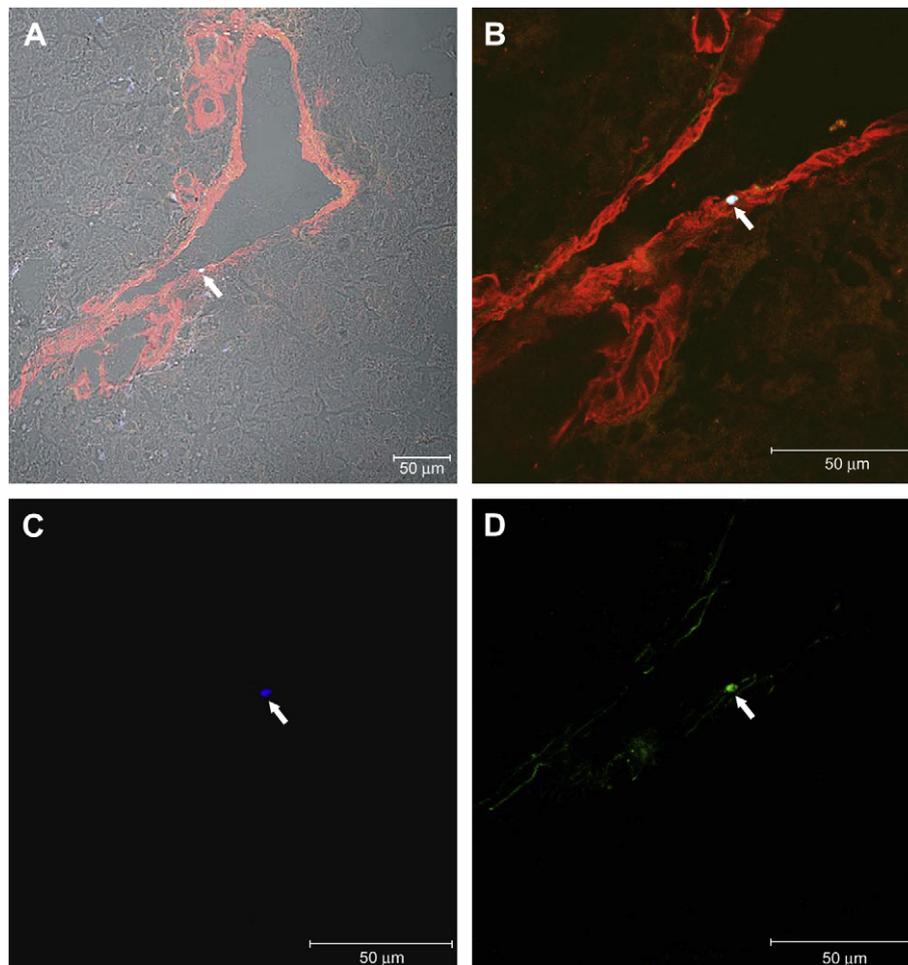


Fig. 2. Confocal laser scanning microscopy of liver sections from hepatectomized rats transplanted with bone marrow mononuclear cells stained with DAPI. After 15 min, liver was collected and immunolabeled with anti-CD34 and anti-laminin primary antibodies, and FITC and TRITC-conjugated secondary antibodies, respectively. (A) Overlay of DAPI, FITC (CD34), TRITC (laminin) and DIC images. Laminin surrounds hepatic vessels such as portal vein. The arrow indicates a transplanted bone marrow hematopoietic stem cell in a laminin-rich area. The stem cell presents CD34 labeling and DAPI staining (40×, bar = 50 µm). (B) Overlay of fluorescence images in high magnification (63×, bar = 50 µm). (C) DAPI nuclear staining in high magnification. (D) CD34 labeling in high magnification.

group). For control groups and 1 day and 3 day experimental groups, liver sections fixed in acetone were incubated with polyclonal rabbit anti-rat laminin (Sigma–Aldrich) primary antibody, followed by incubation with anti-rabbit FITC-conjugated secondary antibody and staining with Evans blue dye 1:5000 for 15 min to detect hepatocytes. The sections were mounted and observed under a laser scanning confocal microscope, Zeiss LSM 510 META.

### 3. Results and discussion

Data obtained by confocal microscopy show that laminin expression in the liver 15 min after partial hepatectomy is similar to the normal liver, being restricted to the portal vessels and centrilobular veins (Fig. 1A and B). However, 1 day (Fig. 1C and D) and 3 days (Fig. 1E and F) after partial hepatectomy, laminin expression is also observed in the regenerating hepatic sinusoids. These findings are in agreement with Wack et al. (2001), in which laminin expression increases after partial hepatectomy in rats, especially in hepatic sinusoids. In this hypothesis, laminin may guide the migration of newly formed endothelial cells through the regenerating hepatic parenchyma, contributing to the final result of the post-hepatectomy

regenerated liver as an apparently normal liver in morphology and function.

For the first time, it has been shown here a CD34<sup>+</sup> HSC adhered to the portal vein wall expressing high levels of laminin, 15 min after partial hepatectomy followed by BMMNCs transplantation (Fig. 2). We suggest that laminin located in the branches of hepatic portal veins may act as an adhesive molecule to HSCs, and therefore this protein may play a role after a hepatic injury by attracting bone marrow cells injected in the portal vein, preventing the loss of these cells through blood circulation. Moreover, 1 day (Fig. 3A and B) and 3 days (Fig. 3C and D) after partial hepatectomy followed by BMMNCs transplantation, the transient increase in laminin expression in the proliferating sinusoids is correlated with the localization of the transplanted bone marrow cells near this laminin-rich area.

Initially, bone marrow cells might adhere to laminin in the portal vein, the vessel in which cells are injected. The natural course of liver regeneration after partial hepatectomy, with increased laminin expression in hepatic sinusoids, can favor the chemotaxis and migration of the transplanted cells to the hepatic parenchyma, where these cells can exert a paracrine effect. Noteworthy, laminin has been described as an adhesive molecule

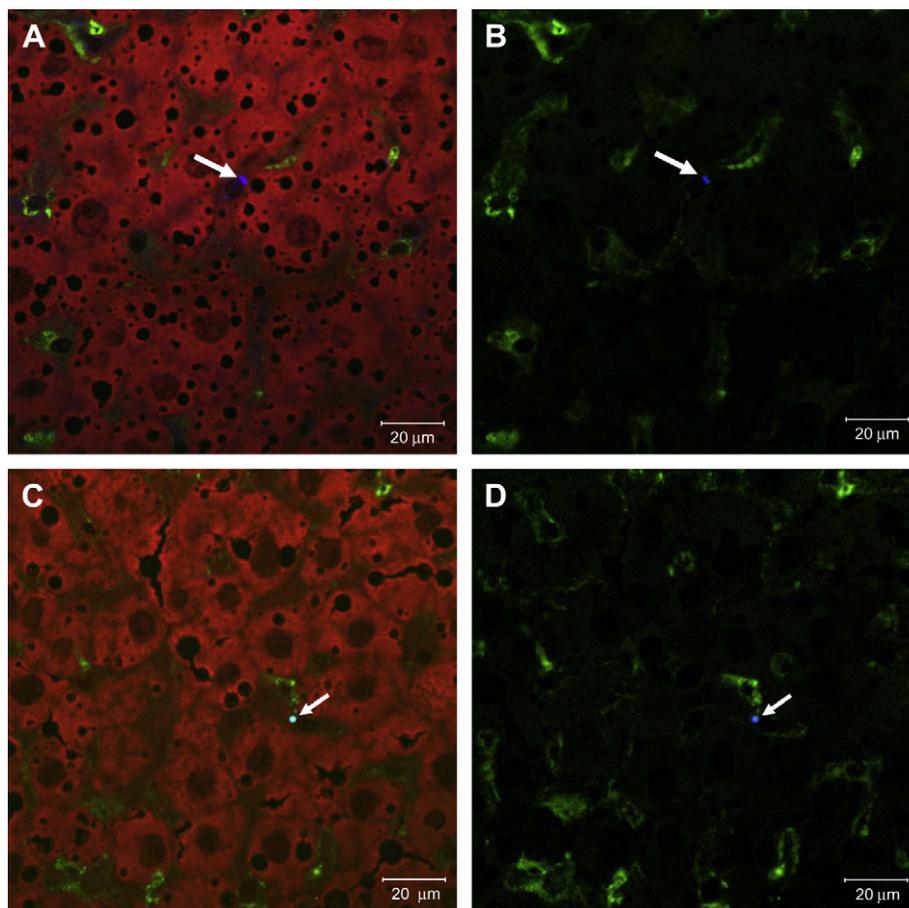


Fig. 3. Confocal laser scanning microscopy of liver sections from hepatectomized rats transplanted with bone marrow mononuclear cells stained with DAPI. Immunolabeling with anti-laminin primary antibody and FITC-conjugated secondary antibody, followed by Evans blue staining. The arrows indicate bone marrow cells in the hepatic sinusoids expressing laminin (A, C). Overlay of DAPI, FITC (laminin) and Evans blue images (B, D). Overlay of DAPI and FITC (laminin) images (A, B) 1 day group (63 $\times$ , bar = 20  $\mu$ m). (C, D) Three days group (63 $\times$ , bar = 20  $\mu$ m).

that interacts with hematopoietic stem cells *in vitro*, resulting in proliferation and enhanced engraftability of these cells after transplantation into irradiated hosts (Sagar et al., 2006).

Despite the fact that bone marrow cells can contribute to liver regeneration in animal models of hepatic injury such as induction of fibrosis (Sakaida et al., 2004) or after partial hepatectomy (Fujii et al., 2002), the mechanisms involved in this process are still obscure (Thorgeirsson and Grisham, 2006). The initial idea of direct differentiation of hematopoietic stem cells into hepatocytes proposed by Lagasse and colleagues (Lagasse et al., 2000) is now being reconsidered by the hypothesis of bone marrow cell fusion with the host hepatocytes (Wang et al., 2003), leading to a genetic reprogramming that can repair inborn errors of the hepatic metabolism in transgenic mice. However, recent studies discuss the real frequency in which fusion and/or differentiation events can occur (Khurana and Mukhopadhyay, 2007). Furthermore, bone marrow cells might act as a paracrine supply of growth factors and cytokines that stimulate the proliferation of hepatic cells in the regenerative process (Thorgeirsson and Grisham, 2006).

Taken together, our results showed the localization of BMMNCs and HSCs transplanted into hepatectomized livers near specific sites of laminin expression during liver regeneration, such as the portal veins and hepatic sinusoids. Therefore, we hypothesize that laminin might act as an adhesive and chemotactic molecule playing a role in BMMNCs signaling and migration to specific areas where these cells could act as paracrine secretors of cytokines and growth factors to support hepatic regeneration.

### Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação

Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (Capes).

### References

- Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:893–9.
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002;36:653–9.
- Khurana S, Mukhopadhyay A. Characterization of the potential subpopulation of bone marrow cells involved in the repair of injured liver tissue. *Stem Cells* 2007;25:1439–47.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006;87:343–59.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000;6:1229–34.
- Sagar BM, Rentala S, Gopal PN, Sharma S, Mukhopadhyay A. Fibronectin and laminin enhance engraftability of cultured hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:1000–5.
- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304–11.
- Sasaki T, Fassler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 2004;164:959–63.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006;43:2–8.
- Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;33:363–78.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897–901.
- Yu Y, Yao AH, Chen N, Pu LY, Fan Y, Lv L, et al. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration. *Mol Ther* 2007;15:1382–9.