



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

Daniela Caldas de Andrade

**Estudo do efeito do transplante de células mononucleares
de medula óssea na bioenergética mitocondrial de ratos com
fibrose hepática**

Rio de Janeiro

2014

Daniela Caldas de Andrade

Estudo do efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na bioenergética mitocondrial de ratos com fibrose hepática

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^a. Dra. Laís de Carvalho

Coorientadora: Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Rio de Janeiro

2014

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

A553 Andrade, Daniela Caldas de.
Estudo do efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na bioenergética mitocondrial de ratos com fibrose hepática / Daniela Caldas de Andrade. - 2014.
80 f.

Orientadora: Laís de Carvalho.
Coorientadora: Erika Afonso Costa Cortez Marques.

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

1. Cirrose hepática - Teses. 2. Colestase - Fisiopatologia. 3. Metabolismo Energético - Fisiologia. 4. Mitocôndrias Hepáticas - Ultraestrutura. 5. Células da Medula Óssea. I. Carvalho, Laís de. II. Marques, Erika Afonso Costa Cortez. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.6-004

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

Assinatura

Data

Daniela Caldas de Andrade

Estudo do efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na bioenergética mitocondrial de ratos com fibrose hepática.

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 04 de agosto de 2014.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Laís de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dra. Loraine Campanati Araujo de Andrade

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Dra. Simone Nunes de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Helene Santos Barbosa

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai José Maria, minha mãe Elza e meu irmão Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele não sou nada. Obrigada pelo alento nos momentos de sofrimento e aflição.

Aos meus pais, José Maria e Elza, meus maiores exemplos. Agradeço pelo incentivo e orientação, pelas orações e preocupação. Ao meu irmão, Guilherme, meu companheiro e cúmplice.

A Prof^a Dra. Laís de Carvalho, minha orientadora e coordenadora do Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco, do Departamento de Histologia e Embriologia (LPCT/DHE/UERJ), agradeço pela oportunidade, incentivo e confiança. Agradeço também pelos conselhos e pelo conhecimento tão generosamente ofertados que por certo serão de grande ajuda no meu futuro profissional e crescimento pessoal.

A Prof^a Dra. Erika A. C. Cortez, LPCT/DHE, minha coorientadora no desenvolvimento desse projeto, agradeço pela paciência, apoio e dedicação. Agradeço, ainda, pela generosidade em partilhar o conhecimento e por guiar meus passos nesse novo universo.

A Prof^a Dra. Simone Nunes de Carvalho, LPCT/DHE, agradeço por ser um modelo de profissional, pela paciência e dedicação. Agradeço por ter me ajudado e incentivado nos meus primeiros passos como futura cientista, ainda na iniciação científica.

A Prof^a Dra. Alessandra Alves Thole, LPCT/DHE, agradeço pelos momentos de descontração e aprendizado em cultura de células.

A Prof^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado, do LPCT/DHE, pelo apoio, cuidado e preocupação que demonstra e por transmitir seus conhecimentos de maneira tão generosa e terna.

As amigas Camila Luna da Silva e Genilza Pereira de Oliveira, pela ajuda, compreensão e pelos momentos de descontração. Agradeço também pelos conselhos, amizade, confiança e cumplicidade.

A amiga e aluna de iniciação científica, Daphne Pinheiro, agradeço imensamente pela ajuda durante o desenvolvimento desse trabalho, pelas risadas nos momentos de cansaço e pelos conselhos e incentivo.

As alunas de iniciação científica Isabelle Dias, Luana Leirós, Thiago Alves meu muito obrigado pela ajuda, alegria e disponibilidade.

As alunas de pós-graduação Rafaelle de Lira, Luciana Lopes e Mariana Oliveira pela ajuda e momentos de descontração.

Aos funcionários e técnicos do DHE/ UERJ, especialmente João Roberto Perez, Ana Lúcia Rosa Nascimento, Alan Cesar Nunes de Moraes e Josefa da Silva Alves, pela simpatia e por me acolherem com carinho.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

RESUMO

ANDRADE, Daniela Caldas de. *Estudo do efeito do transplante de células mononucleares de medula óssea na bioenergética mitocondrial de ratos com fibrose hepática*. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A disfunção mitocondrial tem sido associada a várias doenças, incluindo a colestase hepática, caracterizada pela ativação de células de Kupffer e células fibrogênicas, as quais produzem matriz extracelular excessiva. O acúmulo de sais biliares tóxicos no parênquima hepático leva à lesão crônica com dano mitocondrial, redução da síntese de ATP, aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose, resultando em comprometimento da função hepática. Trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram o efeito positivo do transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMO) na resolução da fibrose hepática e recuperação da função hepática em ratos com colestase, induzida pela ligadura de ducto biliar (LDB). Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a bioenergética mitocondrial após o transplante de CMMO no fígado de ratos com fibrose induzida por ligadura de ducto biliar (LDB). Ratos *Wistar* machos foram divididos em quatro grupos: animais normais, animais com fibrose hepática após 14 e 21 dias de LDB (F14d e F21d, respectivamente), e animais que após 14 dias de LDB receberam 1×10^7 CMMO, e foram eutanasiados sete dias após. Nossos dados demonstraram aumento do conteúdo de colágeno tipo I no grupo F21d em relação ao grupo normal, indicativo de fibrose, e sua diminuição após o transplante de CMMO. A análise da fisiologia mitocondrial do fígado mostrou diminuição significativa da taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) nos grupos F14d e F21d, indicando redução da capacidade de oxidação de carboidratos e ácidos graxos. Além disso, a razão do controle respiratório (RCR), indicativa de acoplamento da fosforilação oxidativa com a produção de ATP, apresentou-se significativamente diminuída nos grupos F14d e F21d, sugerindo desacoplamento mitocondrial. No entanto, o transplante de CMMO aumentou significativamente nestes grupos tanto a capacidade oxidativa quanto o acoplamento mitocondrial a níveis semelhantes aos do grupo normal. Estes resultados foram confirmados por análise de western blotting, que mostrou aumento significativo no conteúdo de UCP2 e diminuição do conteúdo de PGC-1 α no grupo F21d, com consequente restauração após o transplante de CMMO. Além disso, os resultados mostraram um aumento significativo do conteúdo de 4-HNE no grupo F14d com redução após o transplante CMMO. Assim, podemos concluir que o transplante de CMMO tem um efeito positivo sobre a bioenergética mitocondrial de fígados de ratos com colestase, com aumento da capacidade oxidativa e redução do estresse oxidativo, o que, por sua vez, contribui para a recuperação da função hepática.

Palavras-chave: Fibrose hepática, Colestase, Bioenergética mitocondrial,
Mitocôndria, Células mononucleares de medula óssea.

ABSTRACT

ANDRADE, Daniela Caldas de. *Study of the effect of transplantation of bone marrow mononuclear cells in mitochondrial bioenergetics rats with liver fibrosis*. 80f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Mitochondrial dysfunction has been associated with several diseases, including liver cholestasis, which is characterized by activation of Kupffer cells and fibrogenic cells that produce excessive extracellular matrix. Toxic bile salt accumulation in liver parenchyma leads to chronic injury with mitochondrial damage, ATP synthesis reduction, ROS increase and apoptosis, resulting in liver function impairment. Our previous works showed the positive effect of bone marrow mononuclear cells (BMMNC) transplantation on liver fibrosis resolution and hepatic function recover in cholestatic rats. This study aimed to analyze mitochondrial bioenergetics in rats with hepatic fibrosis induced by bile duct ligation (BDL) after BMMNC transplantation. *Wistar* male rats were divided into four groups: normal animals, animals with cholestasis after 14 and 21 days BDL (F14d and F21d, respectively), and animals with cholestasis after 14 days of BDL that received 1×10^7 BMMNC, via jugular vein, and were euthanased after 7 days. The livers were analyzed by high-resolution respirometry and western blotting. Our data demonstrated increased collagen type I content in livers of F21d group compared to normal group, indicative of fibrosis, and its decrease after BMMNC transplantation. Liver mitochondrial physiology analysis showed that F14d and F21d groups have significantly reduced maximum ADP-stimulated respiratory rates (State 3), indicating reduced carbohydrates and fatty acids oxidation capacity. In addition, respiratory control ratio (RCR), indicative of oxidative phosphorylation coupling to ATP production, was significantly decreased in F14d and F21d groups, suggesting mitochondrial uncoupling. However, BMMNC transplantation significantly increased both State 3 respiration and RCR to levels similar to those of normal group, recovering hepatic mitochondrial function. These results were confirmed by WB analysis, which showed that F21d group had a significantly increase in liver mitochondrial uncoupling protein content, UCP2, and reduced PGC-1 α content, a mitochondrial biogenesis co-factor. However, after BMMNC transplantation both proteins returned to levels similar to normal group. In addition, F14d group had a significantly increase in 4-HNE content compared to normal group, indicative of oxidative stress, but after BMMNC transplantation 4-HNE content significantly reduced, compared to normal group, suggesting oxidative stress reduction. Therefore, BMMNC transplantation had a positive effect on hepatic mitochondrial bioenergetics of cholestatic rats, increasing oxidative capacity and reducing oxidative stress, which, in turn, contribute to liver function recover.

Keywords: Liver fibrosis, Cholestasis, Mitochondrial bioenergetics, Mitochondria, Mononuclear bone marrow cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|---|----|
| Esquema 1 | Histologia do fígado | 15 |
| Esquema 2 | Hepatócitos e seus domínios sinusoidais e laterais | 17 |
| Esquema 3 | Mecanismo fibrogênico | 19 |
| Esquema 4 | Desenvolvimento da fibrose hepática | 20 |
| Esquema 5 | Células-tronco de medula e suas linhagens | 22 |
| Esquema 6 | Organização da estrutura da mitocôndria | 24 |
| Esquema 7 | Cadeia transportadora de elétrons | 26 |
| Esquema 8 | Alterações promovidas pelo acúmulo de sais biliares no parênquima hepático | 30 |
| Esquema 9 | Grupos experimentais | 34 |
| Esquema 10 | Procedimento cirúrgico de indução da fibrose hepática .. | 35 |
| Esquema 11 | Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos GFP ⁺ | 37 |
| Tabela 1 | Taxa respiratória do Estado 3 e RCR | 42 |
| Figura 1 | Respirometria de alta resolução de fígado de ratos Wistar | 43 |
| Figura 2 | Análise por Western blotting do conteúdo de colágeno I, PGC-1 α , 4-HNE e UCP2 | 45 |
| Figura 3 | Análise ultraestrutural de mitocôndrias de ratos com fibrose hepática | 47 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| 4-HNE | 4-Hidroxi-2-noneal |
| AP-1 | Ativador da proteína 1 |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BMMNC | Mononuclear bone marrow cells |
| BDL | Bile duct ligation |
| CDCA | Ácido quenodesoxicólico |
| CHE | Célula estrelada hepática |
| CK | Célula de Kupffer |
| CMMO | Células mononucleares de medula óssea |
| CTA | Células-tronco adulta |
| CTEm | Células-tronco embrionária |
| CTH | Células-tronco hematopoiética |
| CTM | Células-tronco mesenquimais |
| CMMO | Células mononucleares de medula óssea |
| EIM | Espaço intermembranar |
| EPM | Erro padrão médio |
| EGTA | Ácido tetracético de etileno-glicol |
| FADH ₂ | Dinucleotídeo de flavina e adenina |
| FH | Fibrose hepática |
| FOX | Fosforilação oxidativa |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| HCV | Vírus da hepatite C |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-6 | Interleucina 6 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IPS | Células-tronco pluripotentes induzidas |
| LCA | Ácido litocólico |
| LDB | Ligadura de ducto biliar |
| ME | Membrana externa |
| MEC | Matriz extracelular |
| MI | Membrana interna |

| | |
|----------------|--|
| MM | Matriz mitocondrial |
| MMPs | Metaloproteinases de matriz |
| NADH | Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina |
| NF κ B | Fator nuclear kappa B |
| NRF-1 | Fator nuclear Respiratório 1 |
| NRF-2 | Fator nuclear Respiratório 2 |
| TFAM | Fator de transcrição mitocondrial A |
| TIMPs | Inibidor específico de metaloproteinase tecidual |
| TMB | Taxa metabólica basal |
| TNF- α | Fator necrose tumoral-alfa |
| TGF- β | Fator de crescimento transformante-beta |
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferação celular |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PGC-1 α | Proliferadores de peroxissoma gama |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SOD | Superóxido dismutase |
| UCPs | Proteínas desacopladoras |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 | OBJETIVO | 32 |
| 2 | METODOLOGIA | 33 |
| 2.1 | Grupos experimentais | 33 |
| 2.2 | Ligadura do ducto biliar (LDB) | 34 |
| 2.3 | Análise da fluorescência das células de sangue periférico de ratos <i>Wistar GFP⁺</i> | 35 |
| 2.4 | Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos <i>Wistar GFP⁺</i> | 36 |
| 2.5 | Análise do enxerto de CMMO GFP+ em animais com fibrose hepática | 37 |
| 2.6 | Respirometria de alta- resolução | 38 |
| 2.7 | Análise do conteúdo de UCP2, PGC-1α, Colágeno I e 4-HNE por western blotting | 39 |
| 2.8 | Ultraestrutura mitocondrial de hepatócitos | 40 |
| 2.9 | Análise estatística | 41 |
| 3 | RESULTADOS | 42 |
| 3.1 | Oxidação de carboidratos e ácidos graxos por respirometria de alta – resolução | 42 |
| 3.2 | Expressão de UCP2, PGC-1α, colágeno I e 4-HNE por Western Blotting | 44 |
| 3.3 | Análise da ultraestrutura | 46 |
| 3.4 | Análise do enxerto de CMMO GFP+ em animais com fibrose hepática | 48 |
| 4 | DISCUSSÃO | 49 |
| | CONCLUSÃO | 53 |
| | REFERÊNCIAS | 54 |
| | APÊNDICE - Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats - artigo submetido | 60 |

INTRODUÇÃO

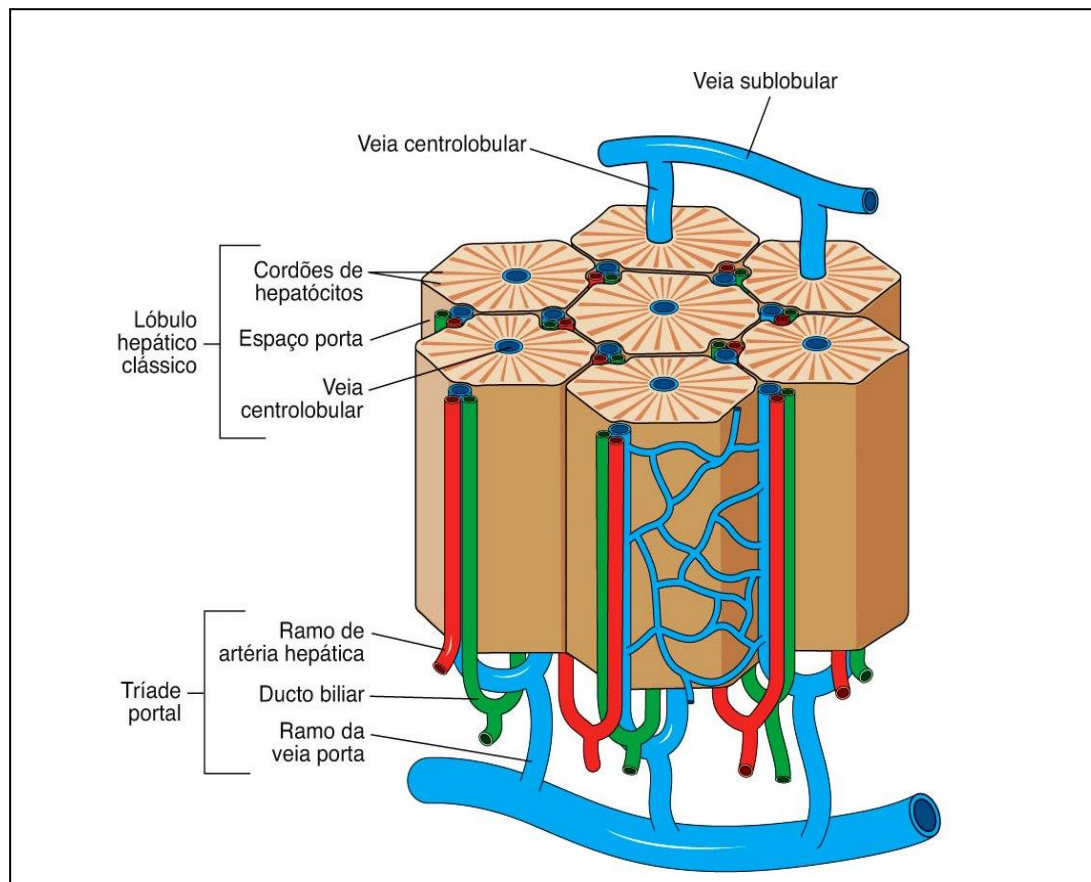
Histologia do fígado

O fígado é considerado o maior órgão do corpo, pesando aproximadamente 1,5 kg. Anatomicamente, ele está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma. O fígado desempenha diversas funções metabólicas, como o processamento e armazenamento de nutrientes absorvidos no trato digestivo, neutralização e eliminação de substâncias (Baratta *et al.*, 2009, Junqueira & Carneiro, 2013). É uma glândula mista, que libera na corrente sanguínea numerosos hormônios e proteínas de grande importância fisiológica que compõem a secreção endócrina do fígado. A bile, liberada no lúmen duodenal, forma a sua secreção exócrina (Eynard, Valentich & Rosavio, 2011).

O fígado é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, que se torna mais espessa no hilo, onde ocorre a penetração da veia porta e da artéria hepática e por onde saem os ductos biliares e os vasos linfáticos que formam a tríade portal. Essas estruturas são envolvidas por um tecido estromal rico em colágeno (Junqueira & Carneiro, 2013) (esquema 1). O fígado é composto por lóbulos hepáticos que possuem formato hexagonal, constituído de hepatócitos dispostos radialmente em direção à veia centro lobular (Ho *et al.*, 2013).

O fígado é altamente vascularizado, sendo que 70- 80 % do sangue que chega ao órgão é pouco oxigenado e rico em nutrientes advindos da veia porta. O restante do aporte sanguíneo é rico em oxigênio e deriva da artéria hepática (Junqueira & Carneiro, 2013). Os capilares sinusoidais situam-se entre as fileiras de hepatócitos, garantindo o suporte sanguíneo para, pelo menos, dois lados dos hepatócitos (Junqueira & Carneiro, 2013). O sangue deixa o fígado pela veia centro lobular com baixa concentração de oxigênio e contendo metabólitos para excreção. A capacidade de regeneração no espaço porta é superior quando comparada com a região próxima à veia centrolobular devido a essa diferença regional do tráfego sanguíneo no fígado, que influencia no metabolismo das células hepáticas (Kmiec *et al.* 2001; Malarkey *et al.* 2005).

Esquema 1 - Histologia do fígado: lóbulos hepáticos.



Legenda: O esquema demonstra os lóbulos hepáticos formados por cordões de hepatócitos delimitado pelo espaço porta onde está localizada a tríade portal, composta por ramos da veia porta, artéria hepática e ducto biliar.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

Na superfície interna do sinusóide hepático, formado por endotélio fenestrado, residem as células de Kupffer (CK), dotadas de prolongamentos e que realizam fagocitose, sendo consideradas macrófagos residentes. Essas células possuem funções específicas atuando na fagocitose de eritrócitos senescentes e na digestão de hemoglobina, além de atuarem nos processos imunológicos como a fagocitose de bactérias que, por ventura, cheguem a esse órgão por intermédio do sangue portal (Bilzec *et al.*, 2006).

As células sinusoidais são separadas dos hepatócitos por um estreito espaço perissinusoidal, também denominado espaço de Disse. Os microvilos dos hepatócitos ocupam grande parte desse espaço facilitando a troca de nutrientes e

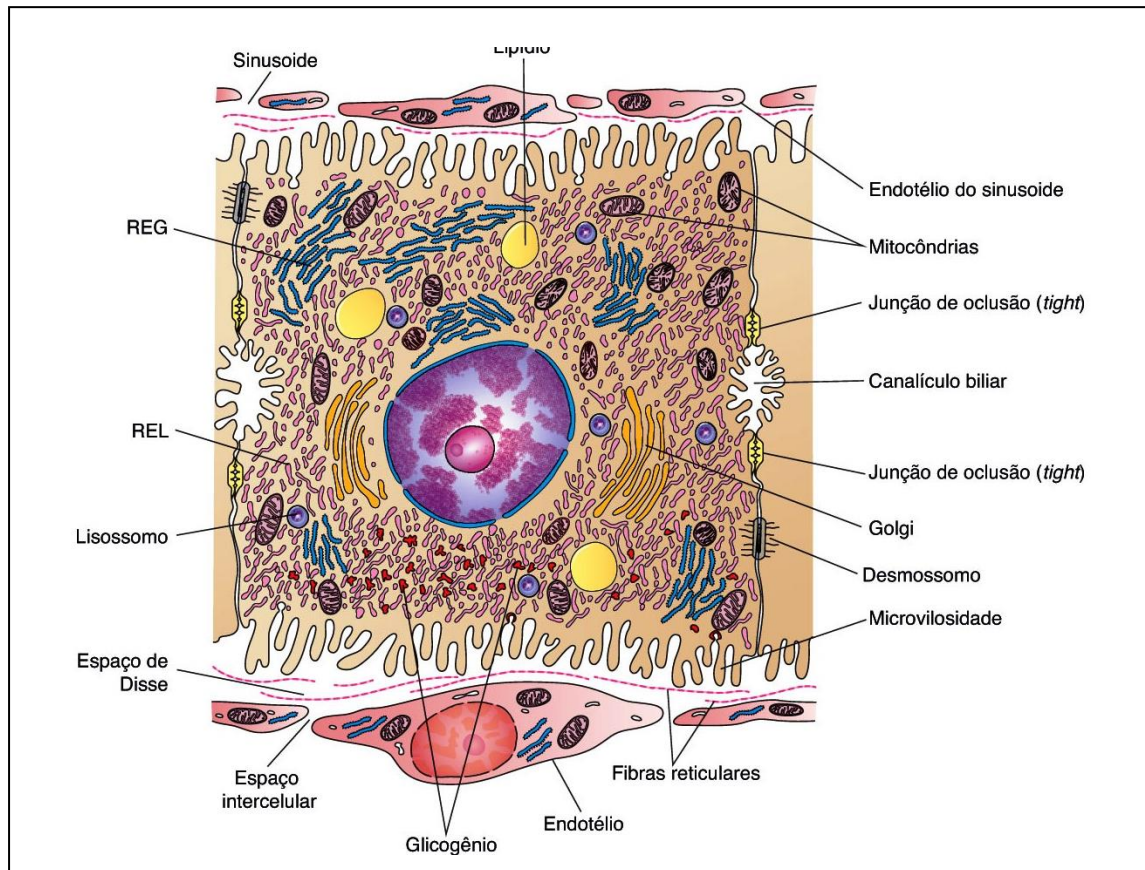
oxigênio entre essas células e a circulação sanguínea (Baratta *et al.*, 2009) (esquema 2). Os fluidos sanguíneos atravessam a parede endotelial e entram em contato com os microvilos dos hepatócitos e, com isso, facilitam a troca de macromoléculas entre o lúmen sinusoidal e os hepatócitos e vice-versa (Kmiec *et al.* 2001; Malarkey *et al.* 2005).

Os hepatócitos tem papel central no metabolismo de quase todos os nutrientes provenientes da digestão, sendo responsáveis por convertê-los em produtos de armazenamento, como o glicogênio. Além disso, os hepatócitos também são responsáveis pela produção de diversas substâncias endócrinas. A bile é uma secreção exócrina sintetizada por essas células e que auxilia a absorção dos lipídeos (Gartner & Hiatt, 2007).

Essas células têm formato poligonal e estão dispostas bem próximas uma das outras, formando placas interconectadas. Os hepatócitos apresentam dispostos em seu citoplasma uma grande quantidade de mitocôndrias e retículo endoplasmático liso bem desenvolvido. A presença dessas organelas é compatível com a grande demanda metabólica atribuída aos hepatócitos. Essas células exibem diferenças em suas características estruturais, histoquímicas e bioquímicas, dependendo da sua localização nos lóbulos hepáticos (Gartner e Hiatt, 2007; Junqueira e Carneiro, 2013).

Nas regiões de contato entre as membranas celulares de dois hepatócitos adjacentes existem junções comunicantes do tipo *gap*, e ocorre a delimitação de um espaço tubular com pequenos microvilos em seu interior, denominados canalículos biliares (esquema 2), sendo esta estrutura a primeira porção do sistema de ductos biliares. Os canalículos biliares formam uma rede complexa e se anastomosam ao longo da placa de hepatócitos, terminando no ducto biliar. Dessa forma, a bile flui do centro para a periferia do lóbulo hepático, onde adentra os dúctulos biliares, também denominados Canais de Hering, que são os menores ramos dos ductos biliares do espaço porta (Junqueira e Carneiro, 2013; Malarkey *et al.*, 2005).

Esquema 2 - Hepatócitos e seus domínios sinusoidais e laterais.



Legenda: Em destaque algumas organelas como mitocôndrias, complexo de golgi, retículo endoplasmático agranular e granular . Espaço de Disse, células sinusoidais fenestradas e canalículos biliares também em destaque.

Fonte: Junqueira e Carneiro, 2013.

No espaço de Disse estão localizadas células que, em estado quiescente, apresentam inclusões lipídicas ricas em vitamina A. Tais células são denominadas células estreladas hepáticas (CEH) e desempenham inúmeras funções no fígado normal, como síntese e secreção de diversas proteínas de matriz extracelular e proteoglicanas. Elas também atuam no metabolismo dos retinóides, secretam fatores de crescimento e citocinas, e ainda, regulam o diâmetro do lúmen sinusoidal (Hellerbrand, 2013).

Fibrose hepática

A fibrose hepática (FH) é um processo patológico promovido por lesões crônicas que propiciam o acúmulo progressivo de matriz extracelular (MEC), rica em fibras colágenas do tipo I, III e IV, laminina, fibronectina, elastina e proteoglicanas (Iredale, 2007; Viedal *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Mallat & Lotersztajn, 2013). A presença de densos septos fibrosos, associados ao desequilíbrio entre a síntese e a degradação de MEC, acarreta perda funcional do parênquima e alteração da estrutura do órgão (Henderson & Iredale, 2007).

O processo inflamatório crônico engatilha a FH, e pode ter origem a partir de diferentes fontes: infecções por HCV, esteatose, abuso de bebidas alcoólicas e sobredoses de medicamentos (Bataller & Brenner, 2005). Diversas células participam desse processo inflamatório, dentre as quais podem ser listadas as células ditas residentes como: as células de Kupffer (CK), as células sinusoidais hepáticas e as células estreladas hepáticas (CEH); além das células inflamatórias recrutadas por sinais proinflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas, dentre outros (Bataller & Brenner, 2005; Brenner *et al.*, 2013).

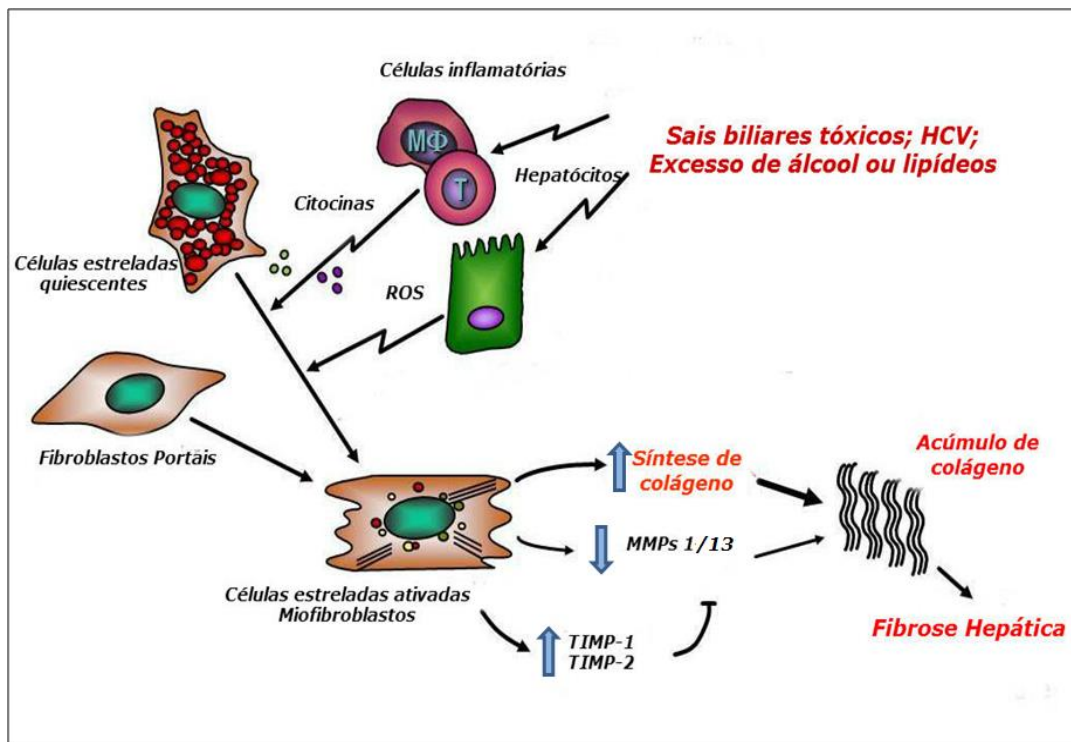
Os hepatócitos são afetados por estas moléculas, o que contribui para ativação da apoptose ou necrose dessas células, acarretando alterações morfológicas e fisiológicas (Brenner *et al.*, 2013). Além disso, ao serem lesionados, os hepatócitos liberam ROS e mediadores fibrogênicos que contribuem ainda mais para o recrutamento de células inflamatórias (Bataller *et al.*, 2005).

A colestase é caracterizada pelo bloqueio do fluxo de bile, levando ao acúmulo de componentes hidrofóbicos de sais biliares que ativam o processo inflamatório característico da FH, sendo a ligadura de ducto biliar o modelo mais usual para o seu estudo (Arduini *et al.*, 2012).

As CK ativadas são conhecidas como as células-chave na colestase hepática, pois elas estimulam a atividade de células fibrogênicas, como as CEH ativas e miofibroblastos (Harty *et al.*, 2008). As CK englobam os corpos apoptóticos de hepatócitos, principalmente, e assim, secretam TGF- β , amplificando a ativação de CEH (Zhan *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2008; Guicciardi *et al.*, 2013). O TGF- β é conhecido como a principal citocina responsável pela ativação das CEH (Hemmann *et al.*, 2007). Na colestase, os miofibroblastos desempenham um papel proeminente

e contribuem para formação de septos fibrosos no espaço porta. As células fibrogênicas são responsáveis pela síntese de componentes de MEC, assim como, pro-MMPs e TIMPs (Mallat & Lotersztajn, 2013) (esquema 3).

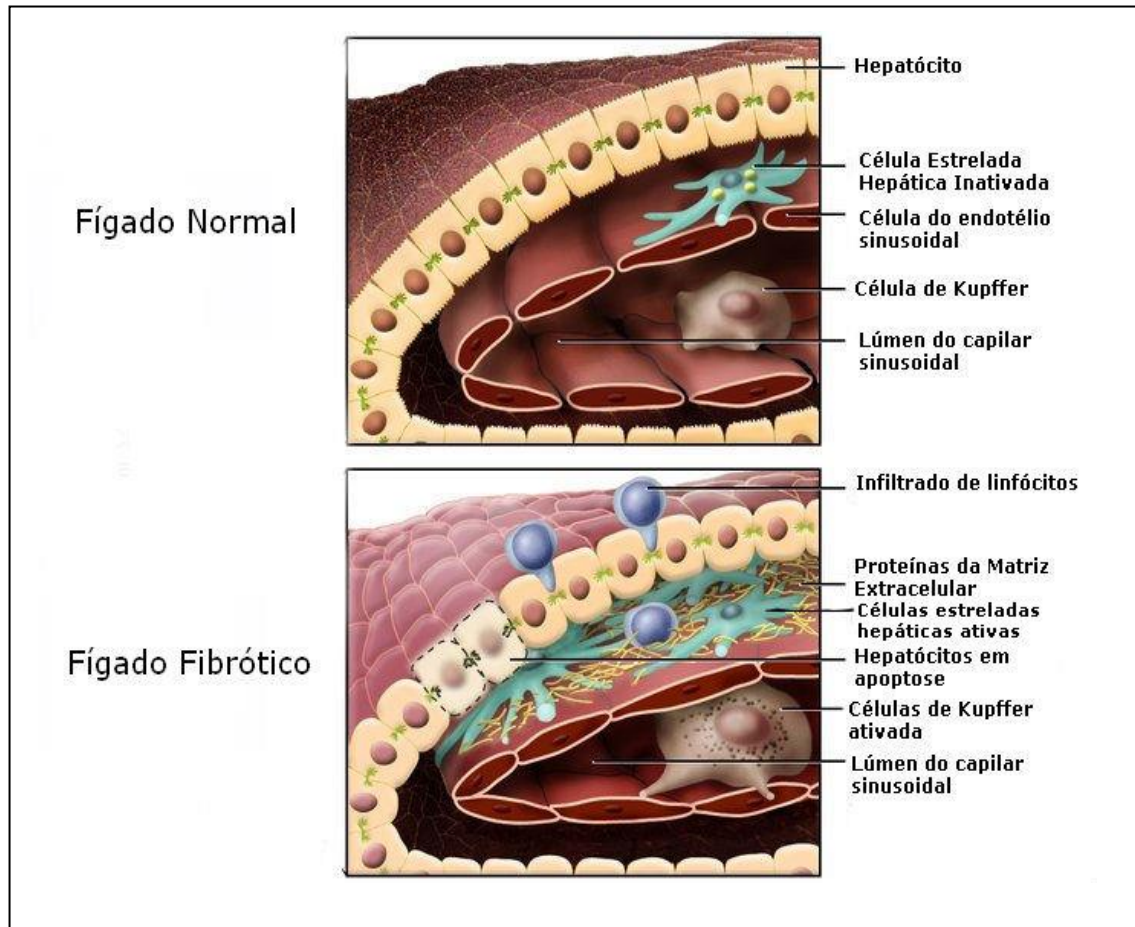
Esquema 3 – Mecanismo fibrogênico.



Fonte: Adaptado de http://www.kernchemie.uni-mainz.de/radiopharmazie-ross/137_ENG_HTML.php.

Ao se tornarem ativas, as células estreladas hepáticas (CEH) proliferam e passam a sintetizar e secretar colágeno, além de outros componentes da MEC. Nesta condição, as CEH expressam α -actina de músculo liso, um marcador de miofibroblastos. As células inflamatórias ativadas, incluindo as CK, são responsáveis pela ativação das CEH e fibroblastos portais por meio da secreção das citocinas TGF- β , IL-1 e TNF- α (fator de crescimento transformante-beta, interleucina – 1 e fator de necrose tumoral – alfa, respectivamente) (Alison *et al.*, 2009; Kupai *et al.*, 2010; Pellicoro *et al.*, 2014) (esquema 4).

Esquema 4 - Desenvolvimento da fibrose hepática.



Legenda: Lesão do hepatócito resultando na estimulação e recrutamento de células inflamatórias exógenas e residentes do fígado (células de Kupffer). Ativação de células estreladas hepáticas (CEH) levando à transdiferenciação a uma célula fenotipicamente semelhante à miofibroblastos. Essa ativação resulta no acúmulo de proteínas de matriz extracelular. Todos os eventos acarretam perda morfológica e funcional do órgão.

Fonte: Adaptado de Bataller *et al.*, 2005.

A cirrose, o estágio final da progressão da fibrose hepática, é caracterizada por uma distorção mais pronunciada da arquitetura do fígado e pela formação de nódulos regenerativos. O transplante de fígado é, para alguns pacientes, a única alternativa viável. No entanto, existem dificuldades em conseguir doadores, e as complicações cirúrgicas devem ser consideradas como risco potencial à vida, além disso, a probabilidade de rejeição do órgão transplantado é elevada. O procedimento é de alto custo, o que justificaria o investimento em pesquisa que ofertassem novas alternativas para o tratamento da fibrose e cirrose hepática. Nesse sentido, a terapia celular, através do uso de células-tronco de medula óssea, é uma alternativa

bastante viável para o tratamento dessas lesões hepáticas (Porada *et al.*, 2010; Houlihan *et al.*, 2008).

Células-Tronco

As células-tronco são auto-renováveis e podem se diferenciar em diversas linhagens celulares. Elas podem ser classificadas de acordo com sua origem em: células-tronco embrionárias (CTE), que se originam de células do embrioblasto, no estágio de blastocisto, e apresentam a habilidade de se diferenciar em qualquer tipo celular dos três folhetos embrionários, sendo pluripotentes; e células-tronco adultas (CTA), que são encontradas em todos os tecidos. Elas já são comprometidas na diferenciação celular específica do tecido onde se encontram, sendo essas células multipotentes (Gilchrist *et al.*, 2010; Lindroos *et al.*, 2011 e Robinton & Daley, 2012).

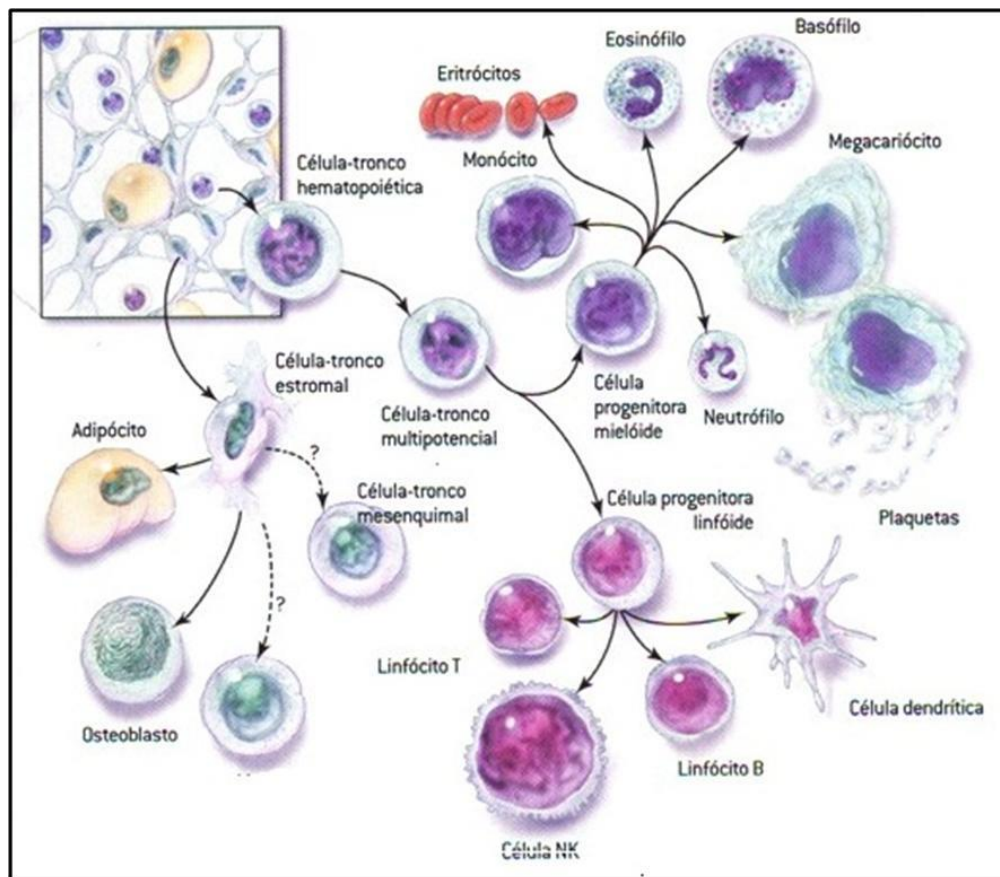
As CTE, por serem pluripotentes, representam uma ferramenta bastante útil na medicina regenerativa, entretanto, a utilização dessas células transpassa questões religiosas e éticas. Uma alternativa para esse problema tem sido proposta por estudos onde células adultas, como fibroblastos oriundos da pele, são transdiferenciadas em CTE, sendo denominadas células-tronco de pluripotência induzidas (IPS). Entretanto, ainda existem questões legais, éticas e de eficácia da terapia (Gilchrist *et al.*, 2010; Lindroos *et al.*, 2011).

Na literatura científica, diversos estudos indicam a presença de células-tronco em todos os tecidos dos órgãos adultos, principalmente a medula óssea, onde duas populações distintas de células-tronco podem ser encontradas: as hematopoiéticas e as mesenquimais (Gilchrist *et al.*, 2010). As células advindas da medula óssea tornaram-se bastante populares na medicina regenerativa devido a seu potencial de diferenciação (Lindroos *et al.*, 2011).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são precursoras das linhagens das células sanguíneas, tendo capacidade de auto-renovação e, ainda, de diferenciação em múltiplas linhagens celulares (esquema 5). As CTH apresentam um elevado potencial terapêutico utilizado há décadas através do transplante de medula óssea. Portanto, essa população celular é a mais caracterizada em termos de isolamento de células e marcadores celulares (Thole, 2010 e Lindroos *et al.*, 2011).

As células-tronco mesenquimais (CTM) fazem parte do estroma da medula óssea e apresentam potencial de diferenciação em células de origem mesenquimal, como osteoblastos, condroblastos e adipócitos (esquema 5). Além disso, as CTM apresentam propriedade imunoreguladora, que reduz a rejeição de enxertos pelos pacientes após o transplante (Lindroos *et al.*, 2011). Existem outras fontes de CTM, como o tecido adiposo e cordão umbilical (Lindroos *et al.*, 2011 e Rankin, 2012).

Esquema 5 - Células-tronco de medula óssea e suas linhagens celulares.



Legenda: As diferentes células advindas das células-tronco hematopoiéticas e das células-tronco mesenquimais, as duas populações de células-tronco adultas presentes na medula óssea.

Fonte: Adaptado de <http://www.afh.bio.br/cardio/Cardio5.asp>.

Bioenergética Mitocondrial

Estrutura Mitocondrial

A mitocôndria é uma organela que ocupa posição essencial na manutenção de diferentes funções celulares. Dentre elas, o metabolismo fisiológico, morte celular e resposta ao estresse oxidativo (Galluzzi et al, 2012). Ela possui diferentes enzimas que fazem parte das principais vias metabólicas, como a oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos (Krauss, 2001).

A principal contribuição da mitocôndria no metabolismo celular é a capacidade de sintetizar ATP, um processo dependente de O_2 denominado fosforilação oxidativa (FOX) (Galluzzi *et al.*, 2012; Maillarix e Harper, 2012). A partir da oxidação da glicose, são gerados, nesse processo, o piruvato e carreadores de elétrons como o NADH e o $FADH_2$. E ainda, ocorre a síntese de ROS (espécies reativas de oxigênio), como um subproduto (Naik e Dixit, 2011; Nunnari e Suomalainen, 2012).

As mitocôndrias estão presentes no citoplasma em diferentes formatos, como: esférico, oval ou filamentoso, dependendo do tipo celular, e até mesmo, do estado fisiológico da célula, e possuem concentração numérica bastante variável, sendo proporcional à demanda energética de cada tecido (Krauss, 2001). São organelas dinâmicas, sendo o seu tamanho e forma associados aos processos de fusão e fissão, fundamentais para a manutenção das suas propriedades funcionais (Detmer e Clan, 2007).

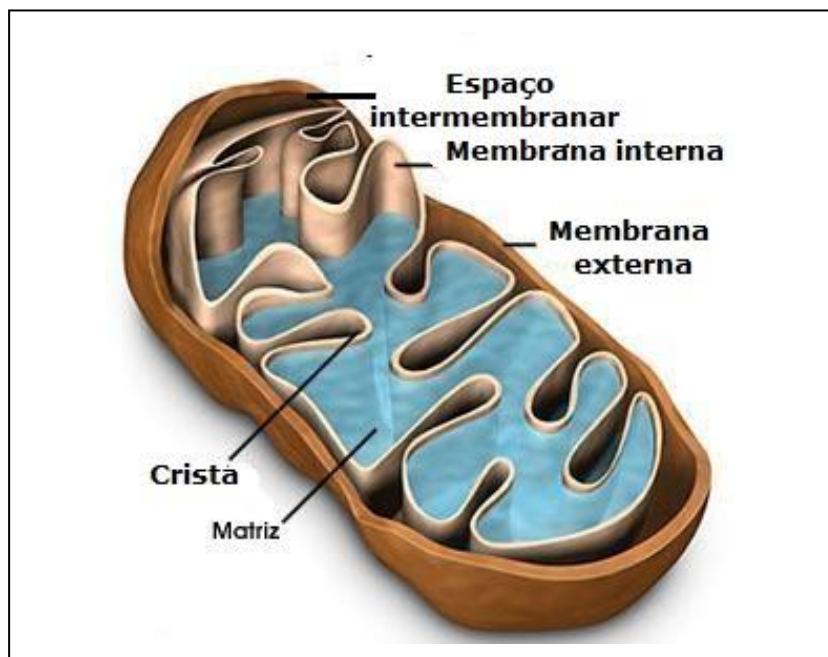
As mitocôndrias apresentam uma estrutura complexa, com duas membranas plasmáticas – membrana interna (MI) e membrana externa (ME), que apresentam diferentes composições, as quais proporcionam diferentes graus de permeabilidade. A ME contém várias proteínas transportadoras, chamadas de porinas, que formam grandes canais aquosos assemelhando-se a um filtro permeável, por onde várias moléculas podem entrar no espaço intermembranar (EIM). Porém, a maioria dessas moléculas não pode passar através da MI, que é altamente especializada e contém uma variedade de proteínas transportadoras que a tornam seletivamente permeável àquelas pequenas moléculas que são metabolizadas ou requeridas pelas várias enzimas mitocondriais concentradas na matriz. Isto faz com que haja uma compartimentalização da mitocôndria, não somente física, mas também funcional. A

MI é geralmente pregueada, formando reentrâncias na matriz chamadas de cristas, que aumentam a área da MI (Krauss, 2001; Bolisetty e Jaimes, 2013) (esquema 6). O EIM contém várias enzimas e é o local onde se acumulam os prótons transportados da matriz (Kowaltowski *et al.*, 2009).

A região limitada pela MI é conhecida como matriz mitocondrial (MM), onde estão localizados, ribossomos e DNA circular, também denominado DNA mitocondrial (mtDNA) (Kowaltowski *et al.*, 2009; Nunnari e Suomalainen, 2012).

O aporte enzimático dessa organela está direcionado a importantes funções metabólicas, que incluem o catabolismo de carboidratos, lipídeos, oxidação de aminoácidos e ureia (Krauss, 2001). A mitocôndria é a principal fonte de NADH, mas também participa da síntese de pirimidinas (Nunnari e Soumalaineu, 2012).

Esquema 6 – Organização estrutural da mitocôndria.



Legenda: A mitocôndria apresenta duas membranas mitocondriais: uma interna e outra externa. A mitocôndria ainda apresenta uma região entre as duas membranas, denominado espaço intermembranar. A membrana interna apresenta projeções em direção a matriz mitocondrial formando as cristas mitocondriais.

Fonte: Adaptado de <http://www.infoescola.com/biologia/mitocondrias-organelascelulares/>.

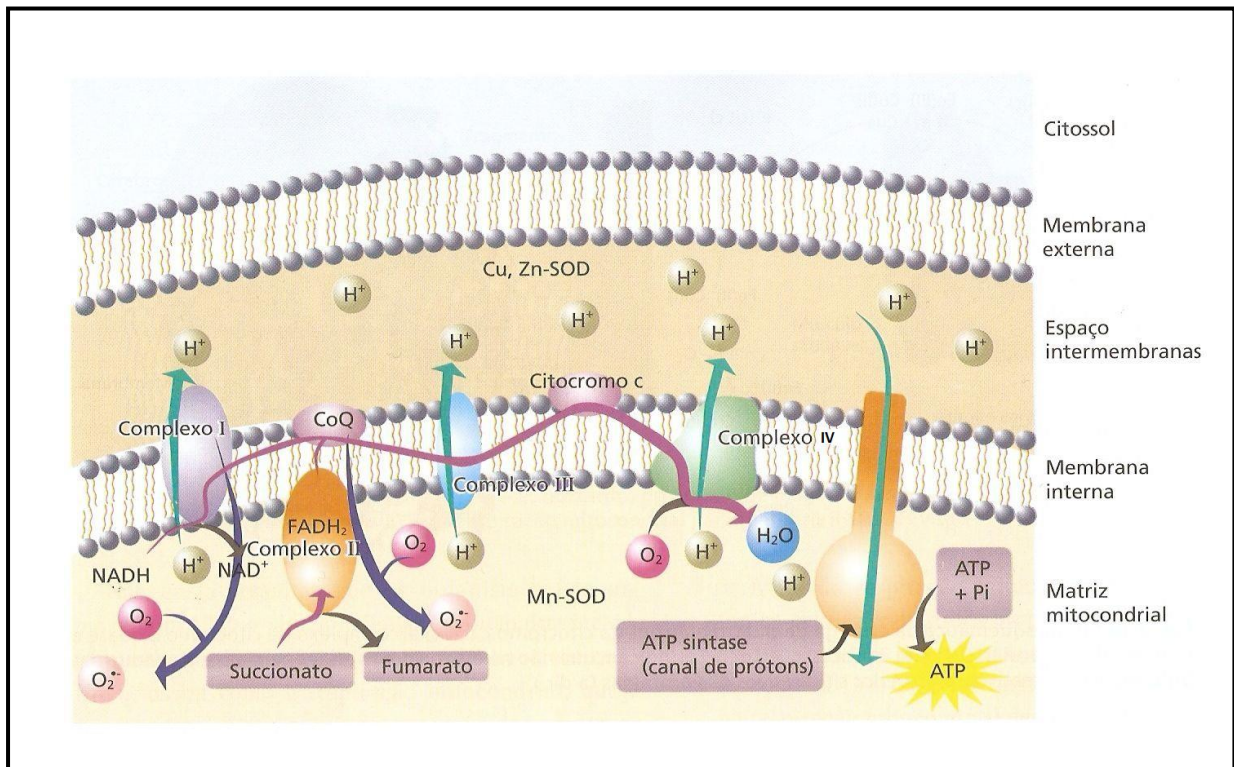
Metabolismo energético

A mitocôndria, em particular, a cadeia transportadora de elétrons (CTE), localizada na MI, mantém a homeostase energética através da fosforilação oxidativa (FOX), principal meio para a síntese de ATP. A FOX é dependente de um conjunto de cinco subunidades polipeptídicas: complexo I (NADH-CoQ redutase), complexo II (succinato-CoQ redutase), complexo III (CoQ-citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (F₀-F₁ ATP sintase) (Krauss, 2001; Nunnari & Soumalaineu, 2012; Mcfarland & Turnbull, 2009; Berardo *et al.*, 2011).

Durante o ciclo de Krebs, ocorre a completa oxidação de carboidratos e ácidos graxos à acetil- CoA, com a produção de aceptores de elétrons como o NADH e FADH₂ (Krauss, 2001; Galluzzi *et al.*, 2012; Nunnari e Soumalaineu, 2012). As enzimas responsáveis pelas reações que compõem esse ciclo estão em sua maioria presentes na MM (Krauss, 2001).

Os elétrons do NADH⁺ e do FADH₂ são transferidos para os complexos I e II da CTE, respectivamente. Estes elétrons são transferidos sequencialmente ao longo da CTE e são doados para o oxigênio (1/2O₂),ceptor final de elétrons no complexo IV, formando H₂O (Opie, 2004). A energia é liberada como fluxo de elétrons ao longo da CTE, sendo utilizada para bombear prótons através da MI para o EIM por meio dos complexos I, III e IV. Através deste bombeamento, cria-se o gradiente eletroquímico de prótons ou força próton-motriz (ΔP), e o potencial de energia armazenado no ΔP pode ser usado para importação de proteínas e Ca²⁺ para o interior da mitocôndria, para gerar calor e sintetizar ATP na MM. Para a síntese de ATP, o fluxo de prótons do EIM para a MM ocorre através da ATP-sintase. O ATP é, então, trocado por ADP citosólico através da proteína translocadora de nucleotídeo de adenina transmembrânica (ANTs) (Johannsen & Ravussin, 2009; Bratic e Trifunovic, 2010) (esquema 7).

Esquema 7 - Cadeia transportadora de elétrons.



Legenda : O elétron carregado pelo NADH produzido no ciclo de Krebs é doado para o complexo I promovendo o bombeamento de H^+ para o EIM, já o elétron fornecido pelo $FADH_2$ para o complexo II não promove o mesmo fenômeno. A passagem de elétron pelos complexos III e IV também promove o lançamento de H^+ para o EIM, gerando um gradiente químico. O retorno dos H^+ pela ATP sintase produz a força-eletromotriz necessária para a produção de ATP. Durante o trânsito de elétrons pela CTE ocorre a formação de ROS.

Fonte: <http://bioradicaislivres.blogspot.com.br/2012/05/uma-relacao-entre-diet-hipercalorica-e.html>.

A eficiência pela qual os equivalentes redutores (a partir da oxidação de acetil-CoA) são convertidos em ATP pela FOX é chamada de acoplamento mitocondrial (Johansen & Ravussin, 2009). Quando as mitocôndrias não são perfeitamente acopladas (desacopladas), a força próton-motriz gerada pela FOX é dissipada sob a forma de calor ao invés de ser utilizada para impulsionar a ATP-sintase na produção de ATP, processo conhecido como "Proton leak". O desacoplamento mitocondrial pode ser responsável por 20 a 25% da taxa metabólica basal (TMB) (Rolfe & Brand, 1997). Este processo é realizado por proteínas desacopladoras (UCPs) situadas na MI, sendo a UCP1 a primeira isoforma descoberta e encontrada somente na gordura marrom de mamíferos, inclusive humanos (Johansen & Ravussin, 2009). No indivíduo adulto, a expressão da UCP1

é limitada, visto que o tecido adiposo marrom está diminuído. Em 1997, duas novas isoformas de UCPs (UCP2 e UCP3) foram descobertas, sendo ambas homólogas à UCP1 e expressas em adultos. A UCP2 é expressa em vários tecidos (incluindo o tecido adiposo, músculo, coração, rins, sistema digestório e cérebro), enquanto que a expressão da UCP3 é maior nos tecidos musculares (Rousset *et al.*, 2004). Tanto a UCP2 quanto a UCP3 tem sido relacionadas à determinação da taxa metabólica basal (TMB).

No estado fisiológico, há um balanço entre a produção de ROS, um subproduto da fosforilação oxidativa, e sua neutralização, o que mantém a homeostase e torna o estresse oxidativo pouco frequente. As ROS, em baixas concentrações, desempenham um papel importante na modulação de vias de sinalização, na proliferação celular e são essenciais para o desenvolvimento das células (Nunnari e Suomalaineu, 2012; Chong *et al.*, 2014). Entretanto, o dano oxidativo é associado com a perturbação deste equilíbrio, sendo incompatível com a viabilidade celular (Sinha *et al.*, 2013).

Em grande parte das células, as ROS são produzidas principalmente pelas mitocôndrias, durante a fosforilação oxidativa pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. Essas moléculas, principalmente ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), quando em altas concentrações, podem promover danos a componentes celulares como: lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Nunnari e Suomalaineu, 2012; Mailloux *et al.*, 2012).

A fim de neutralizar essas moléculas altamente reativas, o organismo desenvolveu defesas antioxidantes que podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas. Sendo a superóxido dismutase (SOD), a enzima antioxidante responsável por converter o $O_2^{\cdot-}$, que é altamente reativo, em H_2O_2 . (Sinha *et al.*, 2013; Kowaltowski *et al.*, 2009). A conversão de $O_2^{\cdot-}$ para uma molécula mais estável, H_2O_2 , é realizada por duas isoformas de SOD, que estão localizadas em compartimentos diferentes no interior da mitocôndria. A Mn-SOD é responsável por essa conversão na MM, enquanto que, a Zn-SOD desempenha sua função no EIM (Kowaltowski *et al.*, 2009).

O H_2O_2 , na presença de metais de transição, como o Fe, gera o OH^{\cdot} , considerada a ROS mais reativa, propiciando a peroxidação de lipídeos e a formação de aldeídos reativos como o 4- hidroxil-trans-2-noneal (4-HNE) (Shimuzu *et al.*, 2012). O H_2O_2 possui elevada permeabilidade, podendo se difundir pelo

citoplasma celular e ser removido pela catalase, pelos sistemas glutathione peroxidase/glutathione e tioredoxina redutase peroxidase/tiorredoxina (Kowaltowski *et al.*, 2009).

Outra estratégia antioxidante é o retorno controlado de H^+ do espaço intermembranar para a MM, sem a síntese de ATP, formando uma baixa taxa de desacoplamento mitocondrial, o que diminui a força eletromotriz e, por consequência, a produção de ROS (Mailloux *et al.*, 2012; Azzu *et al.*, 2010; Kowaltowski *et al.*, 2009). Além disso, os H^+ que retornam para a MM participam da neutralização das ROS, com a consequente formação de água. Esse retorno ocorre através das UCPs, que tem seu conteúdo aumentado em resposta à elevação da síntese de ROS (Azzu *et al.*, 2010; Enochsson *et al.*; 2009).

Diversos estudos apontam o coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α), um coativador transcricional envolvido em diversos processos metabólicos, como, por exemplo, a biogênese mitocondrial e o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos, como um regulador dos níveis de ROS (Liang e Ward, 2006; Austin e St-Pierre, 2012). A superexpressão de PGC-1 α foi relacionada, em estudos anteriores, com a elevação da transcrição de proteínas antioxidantes como MnSOD e a UCP-2 (Valle *et al.*, 2005; St-Pierre *et al.*, 2006).

Disfunção mitocondrial e colestase hepática.

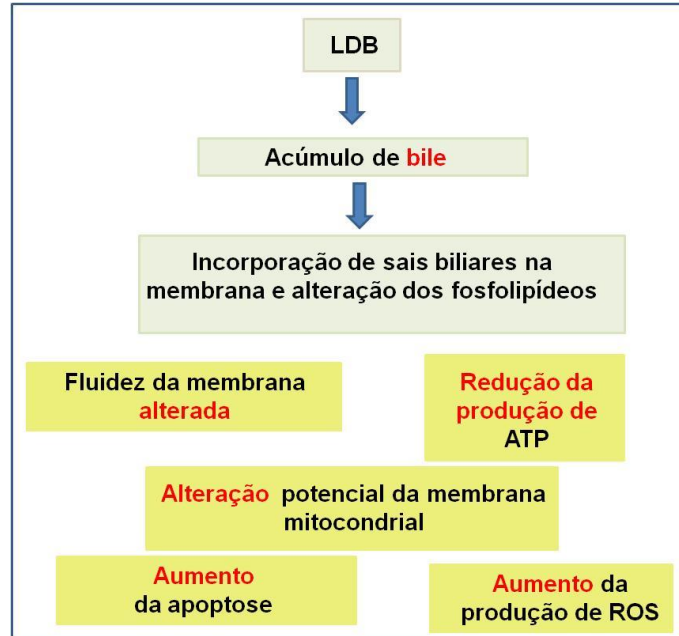
A ligadura do ducto biliar (LDB) é um modelo experimental bem conhecido que consiste na interrupção do fluxo biliar e na retenção de bile tóxica no fígado, processo denominado colestase, que é responsável por alterações bioquímicas e estruturais severas no fígado (Carvalho *et al.*, 2010).

A mitocôndria está relacionada a esse processo patológico, visto que, a disfunção mitocondrial pode ser observada através da perturbação do metabolismo energético com a redução da oxidação de ácidos graxos e a formação de corpos cetônicos (Arduini *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2002). Essa alteração do metabolismo mitocondrial é agravada pelo recrutamento de células inflamatórias, ativação de fatores pro-apoptóticos e pela morte celular (Arduini *et al.*, 2012).

Os ácidos biliares, devido à hidrofobicidade de seus componentes, possuem tendência a citotoxicidade (Rolo *et al.*, 2000). O CDCA (ácido quenodesoxicólico) e LCA (ácido litocólico) são capazes de se incorporar à membrana mitocondrial, com redução da concentração de fosfolipídios, acarretando em alterações na fluidez da membrana e em seu potencial. Esse novo perfil da membrana acarreta, ainda, redução da síntese de ATP, aumento da produção de ROS e elevação da morte celular (esquema 8) (Arduini *et al.*, 2012).

O acúmulo de sais biliares afeta a bioenergética mitocondrial, prejudicando a atividade de complexos da cadeia transportadora de elétrons (Arduini *et al.*, 2012; Krahenbuhl *et al.*, 1994). Diferentes estudos já demonstraram que a incubação *in vitro* de mitocôndrias isoladas com os ácidos biliares acarreta diminuição da respiração mitocondrial máxima estimulada por ADP (estado 3), dado também demonstrado em modelo experimental de colestase (Rolo *et al.*, 2000). Além disso, os ácidos biliares parecem exercer um efeito direto na respiração desacoplada da produção de ATP (estado 4), sugerindo que esses componentes modulam diretamente a atividade das UCPs presentes na MI da mitocôndria. Dados da literatura demonstram que os ácidos biliares causam o aumento de UCP2 no fígado ao nível transcricional já aos 4 e 8 dias após a LDB em ratos (Enochsson *et al.*, 2010).

Esquema 8 - Alterações promovidas pelo acúmulo de sais biliares no parênquima hepático.



Fonte: Adaptado de Arduini *et al.*, 2012.

As regulações, a nível celular, da função e da massa mitocondrial são de suma importância para seu papel vital na produção de energia e sinalização. O processo ativo da biogênese mitocondrial precisa atender à demanda energética específica da célula e é coordenado através da atividade de diversos fatores de transcrição ao nível nuclear, sendo um dos mais relevantes o PGC-1 α (Scarpulla, 2002). Essa proteína promove a transcrição do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), que controla a replicação do mtDNA (Falkenberg *et al.*, 2002; Litonin *et al.*, 2010). A disfunção mitocondrial não é acompanhada da biogênese mitocondrial adequada, visto que, em murinos com colestase houve redução de PGC-1 α após 3 dias da LDB (Tiao *et al.*, 2009).

As mitocôndrias não funcionais são importantes fontes de ROS, que promovem o recrutamento e a ativação de células inflamatórias, inclusive das células de Kupffer. Essas são responsáveis pela produção de citocinas pró-fibrogênicas como o TGF- β , IL-1, TNF- α e IL-6 (Byun e Joeng, 2011 e Kupai *et al.*, 2010), as quais induzem a apoptose em células do parênquima (Mishra *et al.*, 2011).

Além disso, o TGF- β age diretamente sobre as células estrelada hepática, ativando-as e promovendo a produção de matriz extracelular (Alison *et al.*, 2009) que, ao se depositar no espaço perissinusoidal, dificulta o trânsito de nutrientes e oxigênio para os hepatócitos. Isso leva a apoptose dessas células (Forbes e Parola, 2011) e culminando no processo patológico da fibrose hepática.

1 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo geral investigar os efeitos do transplante de células mononucleares de medula óssea (CMMO) sobre a bioenergética mitocondrial hepática em ratos com fibrose hepática induzida por ligadura de ducto biliar.

Objetivos específicos:

1. Analisar a bioenergética mitocondrial a partir da oxidação de carboidratos e ácidos graxos no fígado de ratos com fibrose hepática após o transplante de CMMO, por respirometria de alta-resolução.
2. Analisar o desacoplamento e biogênese mitocondrial no fígado de ratos com fibrose hepática após o transplante de CMMO, por respirometria de alta-resolução e western blotting.
3. Analisar a ultraestrutura mitocondrial no fígado de ratos com fibrose hepática após o transplante de CMMO, por microscopia eletrônica de transmissão.

2 METODOLOGIA

2.1 Grupos experimentais

Os animais foram mantidos sob condições padrão, de temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas ($60\pm 10\%$), em ambiente submetido a ciclos de 12 horas de claro e escuro e ciclo de exaustão de ar (15 min/hora) em caixas de polipropileno. Todos os procedimentos experimentais serão realizados de acordo com as normas institucionais de cuidado e uso de animais de laboratório (nº protocolo comitê de ética UERJ- 239/2008). Os grupos experimentais foram compostos por 32 ratos *Wistar* machos de três meses de idade com 250g, sendo eles distribuídos em grupos com número amostral de oito (esquema 9). Os grupos analisados foram:

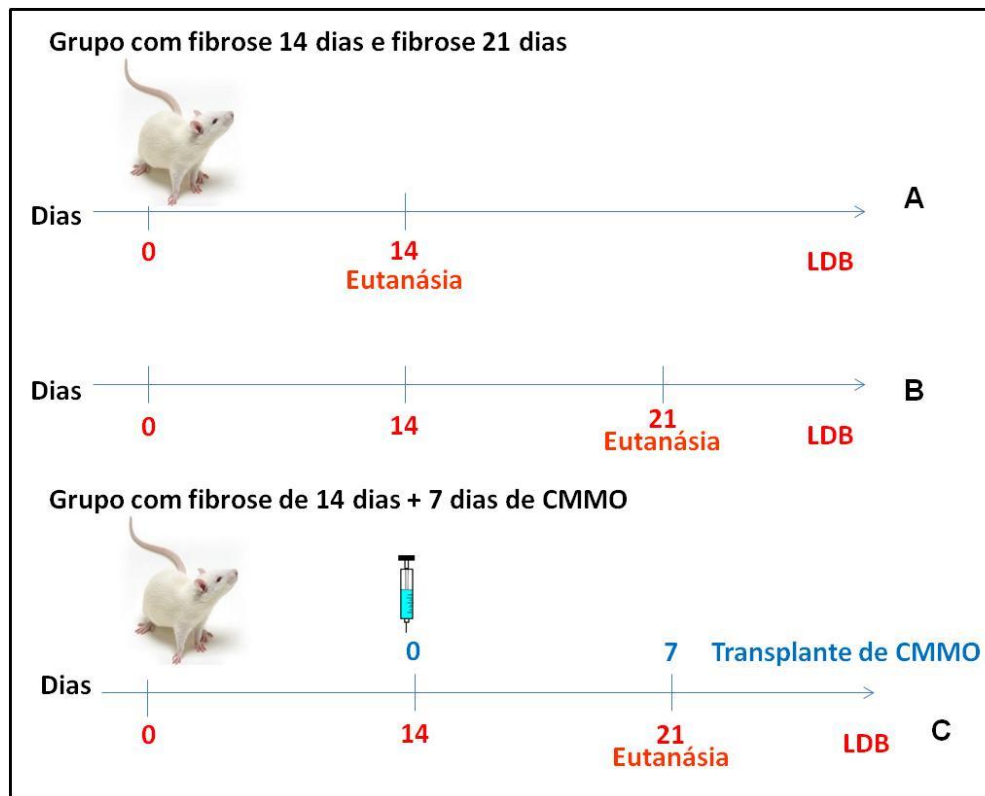
Grupo controle - Ratos Normais

Grupo com fibrose 14 dias (F14d)- submetidos à ligadura de ducto biliar (LDB) e eutanasiados após 14 dias (A).

Grupo com fibrose 21 dias (F21d)- submetidos à LDB e eutanasiados após 21 dias (B).

Grupo com fibrose 14 dias + 7 dias de CMMO (F14d+7dCMMO)- submetidos à LDB e após 14 dias receberam um transplante de CMMO sendo eutanasiados no sétimo dia depois do transplante (C).

Esquema 9 - Grupos experimentais.



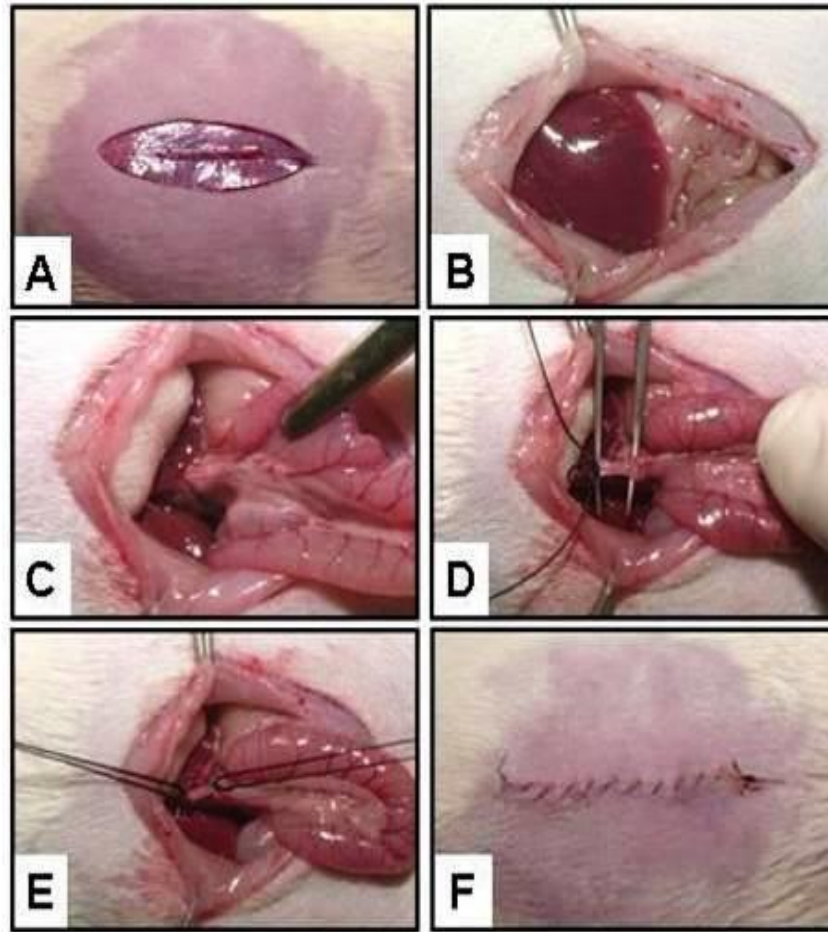
Legenda: Ratos *Wistar* machos de três meses de idade foram utilizados para formar seguintes grupos: Normal (não citado no esquema), F14d (A), F21d (B) e F14d+ 7d CMMO (C).

Fonte: O autor, 2014.

2.2 Ligadura de ducto biliar (LDB)

Ratos *Wistar* machos de três meses de idade foram submetidos à ligadura de ducto biliar. Esses foram submetidos à anestesia inalatória com halotano e, após a assepsia da região abdominal foi realizada incisão e exposição do peritônio (esquema 10- A e B). A alça duodenal foi traçada e o ducto biliar foi localizado (esquema 10- C e D). Com o auxílio de pinças foram realizadas duas ligaduras seguidas de corte no ducto (esquema 10- D e E). As paredes peritoneal e abdominal foram suturadas (esquema 10- F).

Esquema 10 - Procedimento cirúrgico de indução da fibrose hepática por ligadura de ducto biliar.



Fonte: Carvalho, S.N., 2011.

2.3 Análise da fluorescência das células do sangue periférico de ratos *Wistar* GFP+

Animais sadio, de colônia própria e mantidos sobre as mesma condições descritas acima, foram submetidos à anestesia inalatória por haloteno e devidamente identificados por sistema de cores. Foram utilizados três eppendorfs, três tubos falcon de 15 mL e três tubos de citometria para cada animal, sendo os mesmos identificados por cor. Realizou-se um corte na ponta da cauda do animal, após assepsia local com álcool iodado. Cerca de 200 μ l de sangue foram transferidos para os eppendorfs previamente heparinizados. O sangue coletado foi mantido sobre o gelo e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 2000 RPM. O plasma e

o anel de eritrócitos foram coletados e ressuspensos em 3mL de PBS. A amostra foi, então, depositada cuidadosamente sobre 3mL de ficoll hypaque (1077; Sigma) e centrifugada por 10 minutos a 2000 RPM. O anel de CMMO foi coletado e ressuspensão em 12mL de PBS, e, em seguida, centrifugada por 10 minutos a 2000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 600µl de PBS estéril, pH 7,2. Essas amostras foram levadas ao citômetro de fluxo C6 (BD Accuri). Somente os animais com 80% de fluorescência foram selecionados para serem doadores de CMMO.

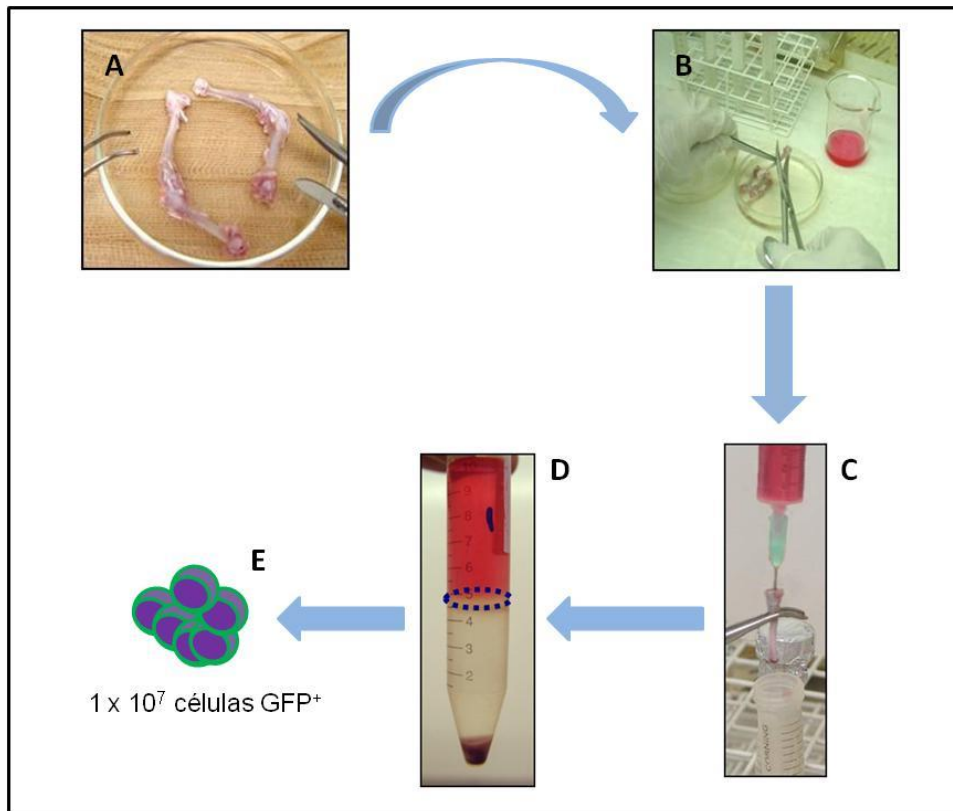
2.4 Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos *Wistar* GFP⁺

Ratos *Wistar* machos GFP⁺ de três meses, saudáveis, foram eutanasiados em câmara de CO₂. Após tricotomia e assepsia, os fêmures e as tíbias foram retirados e transportados para um fluxo laminar onde foi realizada a dissecação dos músculos (esquema 11- A). As epífises foram cortadas e a medula óssea foi exposta (esquema 11- B).

Os ossos foram canulados com uma seringa contendo meio de cultura (DMEM- Sigma) (esquema 11- C). O êmbolo da seringa foi pressionado e os componentes da medula foram carregados para o interior de um tubo falcon. As células foram submetidas ao gradiente de centrifugação conferido pelo ficoll hypaque (1077; Sigma), gerando um anel de células (esquema 11- D).

As células foram lavadas, contadas e coradas com azul de tripan para verificação da viabilidade celular. O conteúdo celular correspondente a 1×10^7 CMMO GFP⁺ foram ressuspensas em 1mL de PBS estéril (esquema 11- E) e injetadas na veia jugular de ratos com 14 dias de fibrose hepática.

Esquema 11 – Isolamento de células mononucleares de medula óssea de ratos GFP+.



Fonte: O autor, 2014.

2.5 Análise do enxerto de CMMO GFP+ em animais com fibrose hepática

Os fragmentos do tecido hepático foram macerados com bisturi, sendo submetidos, em seguida, à agitação com solução de collagenase tipo I (Sigma Aldrich) acrescida de EGTA por 5 minutos. As células dissociadas foram recolhidas e lavadas com DMEM puro. A suspensão de células foi, então, centrifugada por 8 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspensão em 3 mL de PBS estéril e filtrado com o auxílio do Cell Strainer. Uma alíquota de 1 mL de células foi levada ao citômetro de fluxo C6 (BD Accuri) para rastreamento de células GFP⁺, no fígado de ratos *Wistar* com 14 dias de fibrose hepática após o transplante de CMMO GFP⁺.

2.6 Respirometria de alta-resolução

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂. Realizou-se a assepsia da parede peritonial e abdominal. Após localização do externo, dissecou-se o animal até a exposição do fígado. O tecido hepático obtido foi permeabilizado. Um fragmento de 30 a 40mg do fígado foi retirado de cada animal e imediatamente colocado em placa de Petri contendo meio de respiração (MIR05, em mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurina 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1g/L, pH 7.1 ajustado a 25°C) gelado. O fragmento foi separado em 4 a 6 porções pesando 2 a 7mg (aproximadamente 1 a 2mm de diâmetro). Em seguida, realizou-se a permeabilização mecânica utilizando pinças microcirúrgicas, até que o diâmetro da amostra fosse aumentado em torno de 2x e a coloração se alterado de marrom-escuro para marrom-claro. Após, as amostras foram lavadas em MIR05 por 2min sob agitação constante.

Após a permeabilização, as amostras foram pesadas em balança analítica e aproximadamente 5mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2ml de MIR05 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de O₂ superiores a 400 nmol O₂.ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2 e succinato 10, para a análise da oxidação de carboidratos que fornecem elétrons para o complexo I e II, respectivamente, e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0.02 e malato 2, para a análise da oxidação de ácidos graxos gerando elétrons para o complexo I. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), (estado 3), e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina que atua como inibidor da ATP sintase (2 µg/ml), (estado 4). Para examinar a integridade mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

2.7 Análise do conteúdo de UCP-2, PGC-1 α , Colágeno I e 4- HNE por western blotting

Após o sacrifício, amostras dos fígados dos animais foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise do conteúdo proteico através da técnica de western blotting. O material foi picotado e em seguida homogeneizado em solução de lise gelada (em mmol: HEPES 30 pH 7,4, Na₄P₂O₇ 50, NaF 100, EDTA 1, Na₃VO₄ 10, Tritón X-100 1%,) contendo coquetel de inibidores (Complete, EDTA-Free, Roche Diagnostic®), por trituração manual com o homogeneizador potter-Elvehjem® até tornar-se líquido.

O homogeneizado foi colocado em repouso no gelo por 40 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e congelado a -70°C. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de detecção através do Kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific USA, Rockford, IL). Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos com 20% de solução tampão (glicerol 10%, 2- β -mercaptoetanol 5%, SDS 10% NaOH 10N e azul de bromofenol 0,0001%) a 100°C, para desnaturação das proteínas.

As proteínas totais (30 μ g de proteína) foram aplicadas no gel de poliacrilamida de 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, APS 10%, TEMED, SDS 0,4 %, Tris 1,5 M) juntamente com o padrão de peso molecular para proteínas de 12/250 KDA (GE-Healthcare Life Sciences®) e submetidas à eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese (Hoefer MiGOty Small®).

Após a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, estas foram transferidas para uma membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech®), utilizando o sistema semi-dry (Bio-RAD®, EUA). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio Tween-TBS (NaCl 0,5M, Tris-HCl 20mM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários anti-UCP2 obtido em cabra (Santa Cruz), anti-PGC-1 α obtido em cabra (Santa Cruz), anti-colágeno tipo I obtido em cabra (Santa Cruz), anti-4-HNE obtido em camundongo (Abcam) e anti-Actina obtido

em coelho (Sigma-Aldrich) todos a uma diluição de 1:1000, overnight a 4°C. Após as lavagens com T-TBS, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários biotinilados específicos, seguido de estreptavidina-peroxidase (HRP) (Invitrogen), ambos a uma diluição 1:5000 por 1h.

Finalmente, as membranas foram novamente lavadas em T-TBS e as bandas imunomarcadas foram reveladas utilizando um kit de ECL PLUS (Amersham Biosciences). A quimioluminescência foi detectada pelo sistema ChemiDoc MP (Bio Rad). As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria, seguida de correção pelo controle endógeno (Actina), utilizando o software Image J (NIH, USA).

2.8 Ultraestrutura mitocondrial em hepatócitos

Os fragmentos de fígado foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 por 72 horas. O material foi lavado três vezes com tampão cacodilato por 10 minutos e, em seguida, pós-fixado por 30 minutos com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1 % em solução de tampão cacodilato 0,1M, ferricianeto de potássio 0,8%, e CaCl₂ 5%. Após, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato 0,1M por 3 vezes de 10 minutos cada. A desidratação foi realizada em série crescente de acetona: acetona 30%, acetona 50%, acetona 70%, acetona 90% e duas lavagens com acetona 100%, por 30 minutos cada. Em seguida, os fragmentos foram submetidos a banhos de infiltração com epon nas seguintes proporções: 2 acetona 100%: 1 Epon (12 horas com o vidro fechado); 1 acetona 100% : 1 Epon (overnight); 1 acetona 100%: 2 Epon (12 horas com o vidro fechado); primeiro banho puro de epon (24 horas na geladeira); e segundo banho de epon puro (24 horas). Nas últimas 6 horas, os vidros foram mantidos abertos na capela. Após, o material foi incluído em epon e posto para polimerizar em estufa a 60°C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo, recolhidos em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e posteriormente observados ao microscópio eletrônico (CARL ZEISS TEM 906; JEOL JEM 1011).

2.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) one-way com pós-teste de Holm-Sidak. Em todos os casos o nível de significância $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Oxidação de carboidratos e ácidos graxos por respirometria de alta resolução

Ratos com fibrose hepática induzida por ligadura do ducto biliar após 14 (F14d) e 21 dias (F21d) apresentaram redução na capacidade de oxidação tanto de carboidratos como de ácidos graxos, evidenciado pela redução significativa da taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3), comparado ao grupo controle (Tabela 1). Entretanto, o transplante de CMMO em ratos com fibrose hepática (F14d+CMMO7d) foi capaz de restaurar a função mitocondrial desses animais, aumentando a taxa respiratória a níveis semelhantes ao grupo controle (Figuras 1A e 1B).

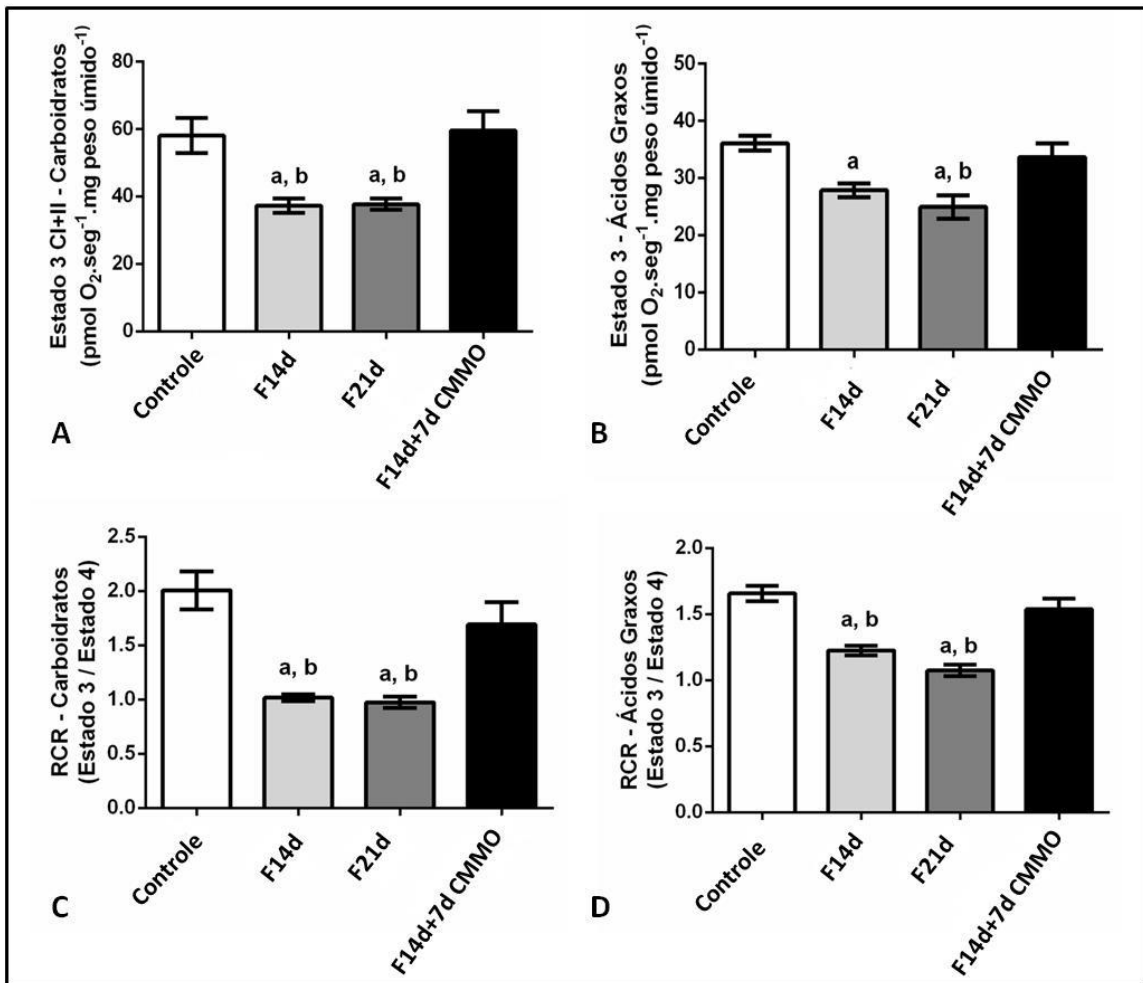
A razão do controle respiratório (RCR, razão Estado 3/ Estado 4), indicativa do acoplamento mitocondrial, diminuiu significativamente nos grupos F14d e F21d, demonstrando menor eficiência mitocondrial na produção de ATP quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Entretanto, o grupo F14d+CMMO7d apresentou RCR significativamente maior, indicando restauração do acoplamento mitocondrial (Figuras 1 C e 1D).

Tabela 1 - Taxa respiratória do Estado 3 e RCR.

| | Controle | F14d | F21d | F14d+7d CMMO |
|---------------------------|------------|------------|-------------|--------------|
| Oxidação de carboidratos | | | | |
| Estado 3 | | | | |
| CI+II | 58,05±5,16 | 37,30±2,16 | 37,72±1,65 | 59,54±5,70 |
| RCR | 2,007±0,18 | 1,017±0,03 | 0,9748±0,05 | 1,692±0,20 |
| Oxidação de ácidos graxos | | | | |
| Estado 3 | | | | |
| | 36,08±1,27 | 27,85±1,22 | 24,92±2,02 | 33,64±2,36 |
| RCR | 1,657±0,06 | 1,226±0,04 | 1,075±0,04 | 1,537±0,08 |

Legenda: Os valores representam a média ± EPM (N=8 por grupo).

Figura 1 - Respirometria de alta resolução de fígado de ratos *Wistar*.



Legenda: (A) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3) com substratos relacionados à oxidação de carboidratos (CHO). (B) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3) com substratos relacionados à oxidação de ácidos graxos. (C e D) Razão do controle respiratório (RCR), calculada como a razão Estado 3/Estado 4 na oxidação de CHO e ácidos graxos, respectivamente. Os dados são expressos como média \pm EPM. "a" representa diferença significativa comparado ao grupo controle, "b" representa diferença significativa comparado ao grupo F14d+ 7d CMMO, com $p < 0,05$. N= 8/grupo .

3.2 Expressão de UCP2, PGC-1 α , colágeno I e 4-HNE por Western Blotting

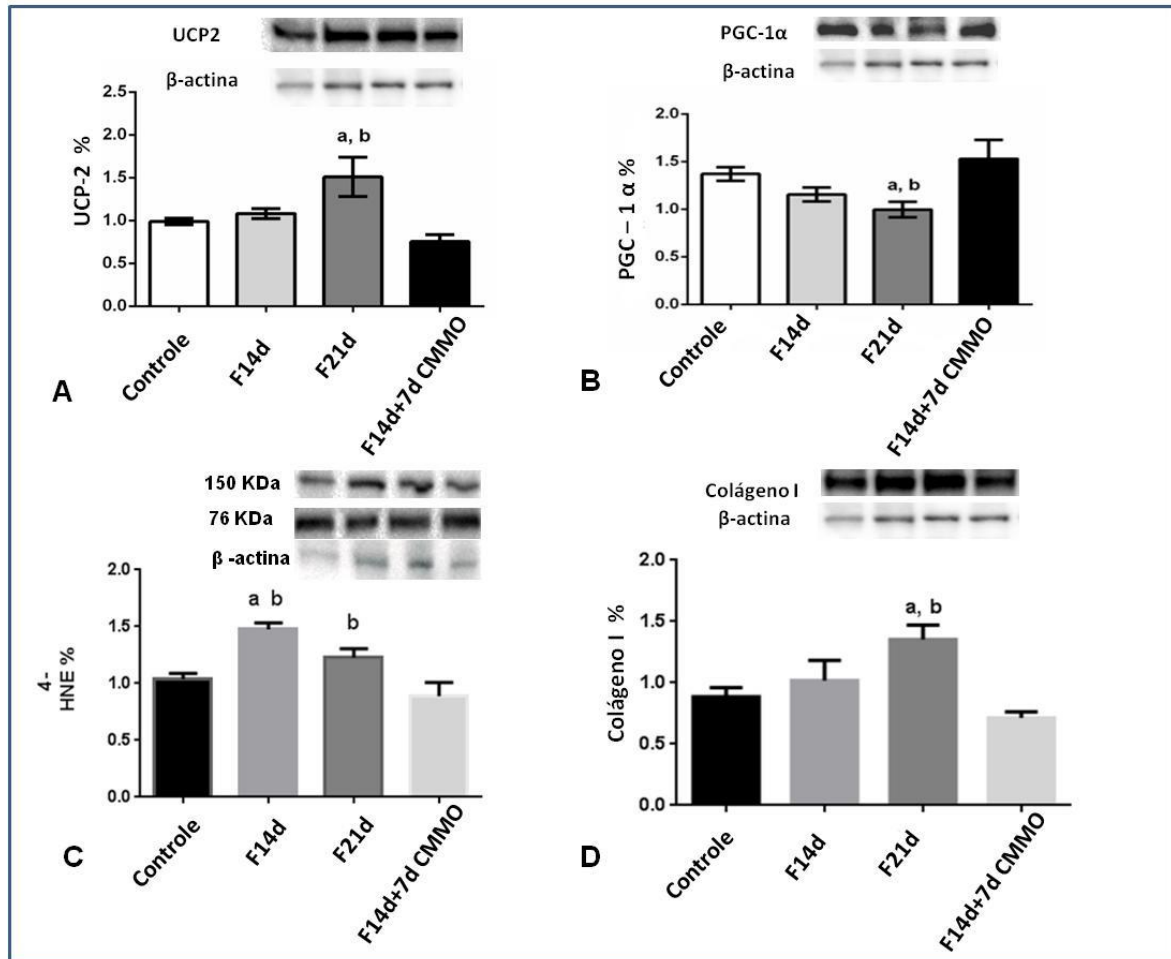
O conteúdo de UCP2, indicativo de desacoplamento mitocondrial, apresentou-se significativamente aumentado no grupo F21d ($1,51 \pm 0,22$) em relação ao grupo controle ($0,99 \pm 0,04$), com consequente diminuição após o transplante no grupo F14d+CMMO7d ($0,75 \pm 0,08$) (Figura 2 A).

Com relação ao conteúdo do cofator de biogênese mitocondrial, PGC- 1 α , os resultados demonstraram redução significativa no grupo F21d ($0,99 \pm 0,08$) em relação ao grupo controle ($1,370 \pm 0,070$) e posterior aumento no grupo F14d+CMMO7d ($1,53 \pm 0,19$) (figura 2 B).

A análise do conteúdo de 4-HNE, indicativo de peroxidação lipídica, evidenciou aumento significativo no grupo F14d ($1,476 \pm 0,055$) em relação ao grupo controle ($1,038 \pm 0,049$). No grupo F14d+CMMO7d ($0,888 \pm 0,118$) houve a redução significativa em relação aos grupo F14d e F21d ($1,288 \pm 0,078$) (figura 2C).

Quanto ao conteúdo de colágeno tipo I, o grupo F21d apresentou aumento significativo ($1,354 \pm 0,1166$) em relação ao grupo controle ($0,8853 \pm 0,07521$), com redução significativa no grupo F14d+CMMO7d ($0,7140 \pm 0,04971$) (figura 2D).

Figura 2 - Análise por western blotting do conteúdo total de (A) UCP2, (B) PGC-1 α (C) 4- HNE e (D) Colágeno tipo I no fígado de ratos Wistar.

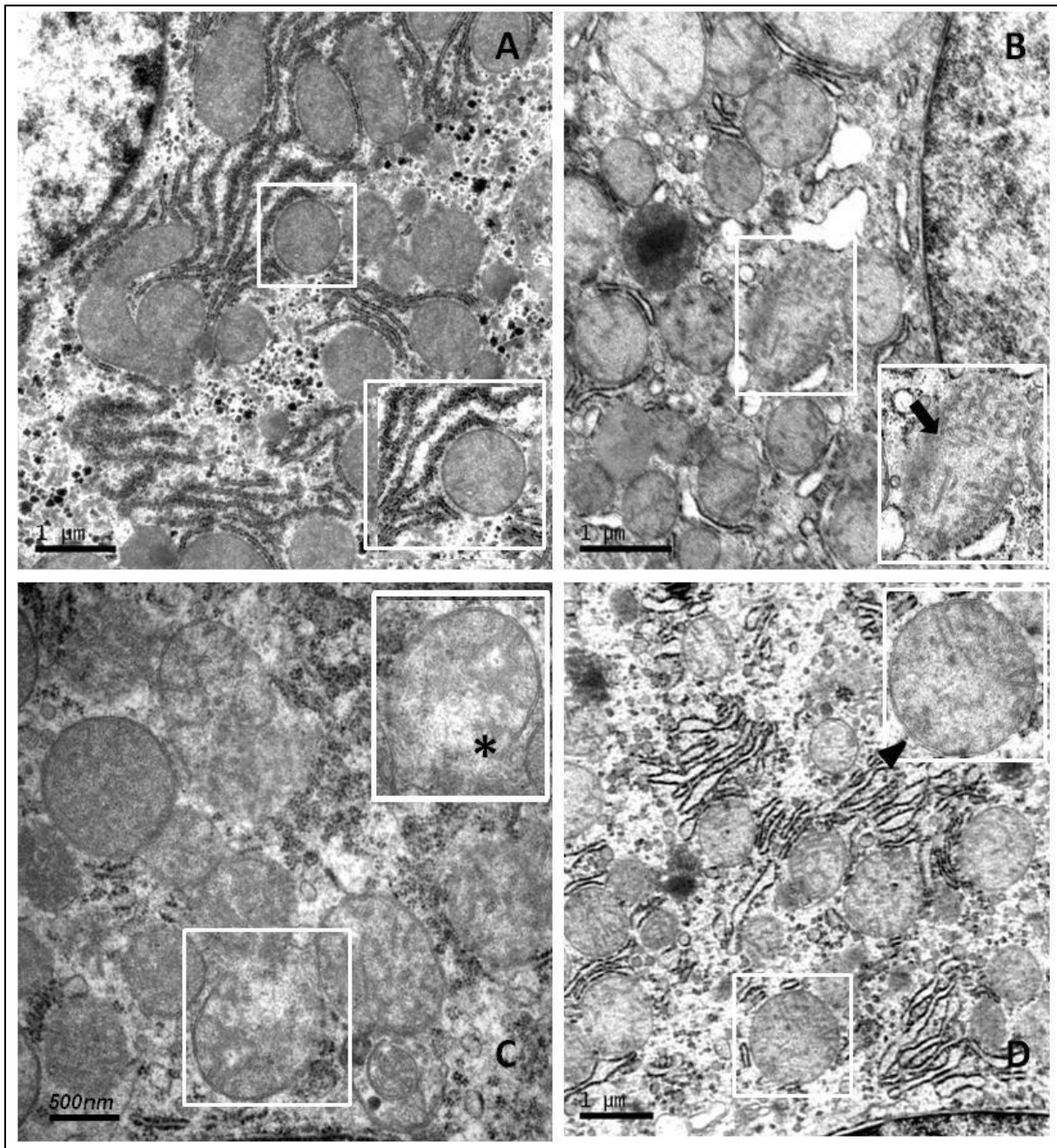


Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM. "a" representa diferença significativa comparado ao grupo controle, "b" representa diferença significativa comparado ao grupo F14d+7d CMMO, com $p < 0,05$. N= 8/grupo.

3.3 Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural das mitocôndrias de hepatócitos do grupo controle demonstrou mitocôndrias com as duas membranas, interna e externa, preservadas e matriz mitocondrial eletrodensa, indicativos de integridade mitocondrial. Já a análise do grupo F14d indicou perda da eletrodensidade da matriz mitocondrial, além da perda da integridade da membrana mitocondrial, apontando dano mitocondrial. As mitocôndrias analisadas no grupo F21d também apresentaram perda da integridade das membranas mitocondriais, com rompimento das mesmas e extravasamento de conteúdo da matriz mitocondrial para o citoplasma. Após o transplante de CMMO, os hepatócitos apresentaram recuperação da integridade das membranas mitocondriais, porém, com recuperação parcial da eletrodensidade da matriz mitocondrial (Figura 3).

Figura 3: Análise ultraestrutural de mitocôndrias hepáticas.



Legenda: No grupo controle (A) (20000X; 60000X), a análise mitocondrial indicou matriz mitocondrial eletrodensa e membrana mitocondrial preservada. Os hepatócitos do grupo F14d (B) (25000X; 80000X) apresentaram perda da integridade mitocondrial e MM mais eletrolúcida (seta), esse padrão se repetiu no grupo F21d (C) (21560X; 60000X) (asterisco). Entretanto, após o transplante com CMMO (D) (25000X; 80000X) houve a recuperação da integridade da membrana mitocondrial (cabeça de seta).

3.4 Análise do enxerto de CMMO GFP+ em animais com fibrose hepática

O resultado da análise das células GFP⁺, por citometria de fluxo, no fígado de ratos com fibrose hepática de 14 dias que receberam transplante de CMMO e foram eutanasiados 7 dias depois (F14d+7dCMMO), indicou 5,25 % de células GFP⁺ demonstrando o sucesso do enxerto das CMMO transplantadas.

4 DISCUSSÃO.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o transplante de CMMO promove a apoptose das células estreladas hepáticas (CEH) e eleva a produção de MMPs, contribuindo, assim, para a redução da fibrose hepática em ratos com ligadura do ducto biliar (Carvalho *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2013). Corroborando esses trabalhos anteriores, nossos dados demonstraram que o transplante de CMMO reduziu significativamente o conteúdo de colágeno I no fígado com fibrose. Sabe-se que a fibrose hepática é caracterizada pela deposição exacerbada de MEC, sendo o colágeno do tipo I um dos principais componentes dessa matriz alterada. O processo inflamatório crônico decorrente da retenção de sais biliares no parênquima hepático promove a ativação de células inflamatórias, apoptose de hepatócitos e a produção de ROS, contribuindo para a ativação de CEH, principal célula fibrogênica (Arduini *et al.*, 2012).

Buscando compreender melhor os mecanismos pelos quais o transplante de CMMO contribui para a resolução da fibrose e restauração da função hepática no fígado com fibrose hepática induzida por ligadura de ducto biliar (LDB), analisamos, pela primeira vez, os efeitos do transplante de CMMO sobre as alterações ultraestruturais, bioquímicas e fisiológicas das mitocôndrias. As mitocôndrias desempenham diversas funções. Além de fornecer ATP, são fundamentais na biossíntese de aminoácidos não essenciais, de hormônios e de precursores de DNA, e, também tem participação nas vias de sinalização de morte e sobrevivência celular. Por conseguinte, a disfunção mitocondrial pode ser manifestada de diferentes formas e estar presente em diferentes processos patológicos agudos e crônicos, tais como: diabetes, cardiomiopatias, insuficiência renal e a fibrose hepática (Jones & Roede, 2010; Mitchell *et al.*, 2009, Arduini *et al.*, 2012).

A modificação da membrana mitocondrial, resultado da incorporação de componentes hidrofóbicos tóxicos dos sais biliares retidos no parênquima hepático devido a LDB, promovem alterações no metabolismo mitocondrial, como redução da β -oxidação, da síntese de corpos cetônicos e, por fim, depleção energética pela diminuição da síntese de ATP (Lang *et al.*, 2001; Arduini *et al.*, 2011; Rolo *et al.*, 2000). Nossos resultados demonstraram que o transplante de CMMO elevou significativamente a taxa respiratória máxima estimulada por ADP, na oxidação de

carboidratos e de ácidos graxos no fígado com fibrose. Além da redução da capacidade oxidativa mitocondrial nos animais com fibrose hepática, nossos resultados também demonstraram redução do conteúdo de PGC-1 α , indicador da biogênese mitocondrial. Este, por sua vez, ativa a expressão de NRF-1 e NRF-2, os quais regulam a expressão do TFAM, que se liga aos sítios regulatórios do mtDNA, regulando a biogênese mitocondrial. A redução da expressão de PGC-1 α em ratos é acompanhada pela menor capacidade de oxidar ácidos graxos (Fink e Kelly, 2006). Porém, a redução da função mitocondrial, normalmente, leva ao aumento da biogênese mitocondrial, como tentativa de compensação funcional (Taio *et al.*, 2009). Entretanto, em situações de lesões crônicas, a biogênese mitocondrial reduz significativamente (Scarpulla, 2002; Liang e Ward, 2006; Austin e St-Pierre, 2012), como ocorreu no grupo F21d deste estudo. Após o transplante de CMMO, pudemos observar os efeitos positivos sobre a biogênese mitocondrial, demonstrado pelo aumento do conteúdo de PGC-1 α , assim como observamos para a função mitocondrial. O PGC-1 α tem papel central no controle do estresse oxidativo, pois controla expressão das enzimas antioxidantes. Assim, seu aumento eleva a função mitocondrial e reduz o acúmulo de ROS, assegurando impacto global positivo sobre o metabolismo oxidativo (Austin e St-Pierre, 2012), corroborando nossos dados.

Nossos resultados também demonstraram que o transplante de CMMO foi capaz de reduzir significativamente o desacoplamento mitocondrial, indicado, tanto pelo aumento do RCR, como pela diminuição do conteúdo de UCP2. Sabe-se que o retorno de prótons do espaço intermembranar de volta para a matriz mitocondrial, através de UCPs, fisiologicamente, contribui para a neutralização de ROS geradas naturalmente pela FOX. Em condições de estresse oxidativo, compatível com o processo inflamatório crônico, onde ocorre elevação da síntese de ROS, há o aumento do conteúdo de UCPs, com elevação do escoamento de H⁺, sendo esta uma estratégia antioxidante, pois reduz a força protomotora, limitando a produção de ROS ao custo da depleção da síntese de ATP (Mailloux *et al.*, 2012; Azzu *et al.*, 2010; Enochsson *et al.*; 2009; Naik e Dixit, 2011).

Nosso estudo também demonstrou a redução significativa do conteúdo de 4-HNE, produto da peroxidação lipídica, após o transplante de CMMO. Durante a fibrose hepática ocorre a elevação da produção de ROS, tanto pelas células inflamatórias quanto pelos hepatócitos lesionados. No fígado com fibrose, as ROS, principalmente o OH⁻, são responsáveis pela produção de peroxidação de lipídios da

membrana plasmática alterando-a de maneira irreversível, ocasionando a destruição de hepatócitos. O 4-HNE apresenta diversas atividades biológicas, participando do recrutamento de neutrófilos, além de ser um indicador indireto das ROS. Ele também está associado à ativação de CEH (Parola *et al.*, 1998). O H₂O₂ participa da ativação de vias AP-1 e NF κ B envolvidos no processo inflamatório e no estresse oxidativo, chaves para a progressão da fibrose hepática (Shimuzu *et al.*, 2012). Assim, a redução do conteúdo de 4-HNE após o transplante de CMMO no fígado com fibrose é um importante indicador da redução do estresse oxidativo, essencial para progressão da fibrose hepática. Além disso, o 4-HNE reduz a produção de IL-6 pela CK, podendo afetar na regeneração hepática, visto que, a IL-6 promove a mitogênese em hepatócitos pela via STAT3 (Cong *et al.*; 2012; Yamaguchi *et al.*; 2011; Luckey *et al.*; 2002). Portanto, a redução do conteúdo de 4-HNE, não somente indica a redução do estresse oxidativo, mas também, aponta um possível mecanismo para o aumento da proliferação de células hepáticas discutido pelo grupo em trabalhos anteriores (Carvalho *et al.*; 2013).

Assim, a elevação da capacidade de oxidação de carboidratos e ácidos graxos, da biogênese mitocondrial e a diminuição do desacoplamento mitocondrial que ocorreram após o enxerto de 5,25% das CMMO transplantadas, e indicam a recuperação do metabolismo energético mitocondrial hepático e a contribuição dessas células para a restauração da função mitocondrial e melhora do quadro de estresse oxidativo, apontando para a redução do processo inflamatório. Isso pode ser explicado pelo efeito parácrino promovido por essas células, que liberam citocinas e fatores antiinflamatórios, como IL-10, capazes de bloquear a síntese de citocinas inflamatórias por macrófagos, com efeitos antifibróticos (Wynn e Barron, 2010; Zheng *et al.* 2013; Shen *et al.*, 2000; Cong *et al.*, 2012).

A função mitocondrial de hepatócitos pode ser alterada por drogas que interferem na oxidação de ácidos graxos e promovem distúrbios na ultraestrutura mitocondrial com matriz eletrolúscida (Vickers, 2009). A análise ultraestrutural das mitocôndrias de hepatócitos demonstrou destruição da ultraestrutura mitocondrial nos grupos F14d e F21d, com perda da integridade da membrana mitocondrial. Essas alterações podem ser explicadas pela alteração dos componentes da membrana mitocondrial, já que há integração de componentes hidrofóbicos dos sais biliares à membrana com consequente perda de fosfolipídios (Arduini *et al.*; 2012). Além disso, a matriz mitocondrial nesses grupos apresentou-se eletroluscente e

pouco preservada, condizente com resultados acima apresentados e representativos de disfunção mitocondrial. Entretanto, após o transplante de CMMO houve recuperação da integridade da ultraestrutura mitocondrial, corroborando a recuperação fisiológica observada.

CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que o transplante de CMMO é capaz de promover a restauração do metabolismo energético e da ultraestrutura mitocondrial no fígado de ratos com fibrose hepática induzida por ligadura de ducto biliar, contribuindo para a resolução da fibrose e reestabelecimento da função hepática.

REFERÊNCIAS

- ALISON, R.M.; ISLAM, S.; et al. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and ugly. *Journal Pathology*, v.217, n.2, p. 282-98, Jan. 2009.
- ARDUINI, A.; SERVIDDIO, G.; TORMOS, A. M.; MONSALVE, M.; SASTRE, J. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. *Front Biosci. (Elite Ed.)*, v.1, n.4. p. 2233-2252, jan2012.
- AUSTIN, S.; St-PIERRE, J.; PGC-1 α and Mitochondrial Metabolism- Emerging Concepts and Relevance in Ageing and Neurodegenerative Disorders. *Journal of Cell Science*. v. 125, n. 21, p. 4963- 4971, 2012.
- AZZU, V.; JASTROCH, M.; DIVAKARUNI, A. S.; The Regulation and Turnover of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Biochim. Biophys Acta*. v. 1797, n. 6-7, p. 785-791, 2010.
- BARATTA, J.L.; NGO, A.; LOPEZ, B.; et al. Cellular Organization of Normal Mouse Liver: A Histological, Quantitative Immunocytochemical, and Fine Structural Analyses. *Histochem Cell Biol.*, v.131, n.6, p. 713-726, jun. 2009.
- BATALLER, R.; BRENNER, D.A. Liver Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.2, p.209- 218, fev. 2005.
- BERARDO, A.; MUSUMECI, O.; TOSCANO, A.; Cardiological Manifestations of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders. *Acta Myologica*, v. XXX, p. 9-15, 2011.
- BRATIC, J.; TRIFUNOVIC, A.; Mitochondrial Energy Metabolism and Ageing. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1797, p. 961- 967, jan 2010.
- BRENNER, C.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; et al. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.*, v. 59, n.3, p. 583-594, sep. 2013.
- BILZEC, M.; ROGGEL, F.; GERBES, A.L.; Role of Kupffer Cells in Host Defense and Liver Disease. *Liver International*. v.26, p. 1175- 1186, jul. 2006.
- BOLISSETTY, S.; JAIMES, E.A.; Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.*, v.14, n.3, p. 6306- 6344, mar 2013.
- BYUN, S.J.; JOENG, I.W. Involvement of Hepatic Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Immune Network*, v.10, n.6, p.181–187, 2010 Dec.
- CARVALHO, S.N.; LIRA, D.C.; OLIVEIRA, G.P.; et al. Decreased collagen types I and IV, laminin, CK-19 and α -SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. *Histochemistry and Cell Biology*, v.134, n.5, p. 493-502, 2010.

CARVALHO, S.N.; HELAL-NETO, E.; ANDRADE, D.C.; et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation increases metalloproteinases -9 and -13 and decreases TIMPs -1 and -2 expression in the liver of cholestatic rats. *Cells Tissues Organs* (Print), 2013.

CARVALHO, S.N.; LIRA, D.C.; CORTEZ, E.A.C.; et al. Bone marrow cell transplantation is associated with fibrogenic cells apoptosis during hepatic regeneration in cholestatic rats. *Biochemistry and Cell Biology* (Print), v. 2, p. 1-7, 2012.

CHONG, S.J.; LOW, I.C.; PERVAIZ, S. Mitochondrial ROS and Involvement of Bcl-2 as a Mitochondrial ROS Regulator. *Mitochondrion*. 19: S1567-7249(14)00087-7, Jun 2014.

CONG, M.; IWASAKO, K.; JIANG, C.; et al. Cell Signals Influencing Hepatic Fibrosis. *International Journal Hepatology*. v.2012, p.1-17. Jun 2012.

DETMER, S.A.; CHAN, D.C.; Function and dysfunctions of mitochondrial dynamics, v. 8, p. 870- 879, nov 2007.

DIMMELER S.; LOSORDO, D.; Stem Cells Review Series: An Introduction. *Circulation Research*, p. 907- 909. sep 2011.

ENOCHSSON, L.; ISAKSSON B.; STROMMER L.; et al. Bile duct obstruction is associated with early postoperative upregulation of liver uncoupling protein-2 and reduced circulating glucose concentration in the rat, *Nutrition*. v.26, p.405-410, 2010.

EYNARD, A.R.; VALENTICH, M.A.; ROVASIO, R.A..*Histologia e embriologia humana: bases celulares e moleculares*.4ª Ed,p. 0 -696, 2011.

FALKENBERG, M.; GASPARI, M.; RANTANEN A.; et al. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA, *Nat Genet* . v.31, p. 289-294, 2002.

FINK, B.N.; KELLY, D.P.; PGC-1 coactivators: Inducible Regulators of Energy Metabolism in Health and Disease. *The Journal of Clinical Investigation*. v.116, n.3, p. 615-622. mar 2006.

FORBES, S.J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 25, n.2, p.207-217, Apr. 2011.

FRIEDMAN, S.L.. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol Rev*. v. 88, n. 1, p. 125- 172, jan. 2008.

FRIEDMAN, S.L.. Hepatic fibrosis – overview. *Toxicology*. v.254,n.3, p.120 -129, Dec. 2008.

GARTNER, P.L.; HIATT, L.J. *Tratado de Histologia em cores*, 3ª Ed., p. 429-442, 2007.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; HANSEN-TROJEL, C.; et al. Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circulation Research*. p. 1198- 1207, oct 2012.

GILCHRIST, S.E.; PELVRIS, N.J. Bone Marrow – Derived Stem Cell In Liver Repair: 10 Years Down The Line. *Liver Transplantation*, v.16, n.2, p.118-29, feb. 2010.

GUICCIARDI, M.E.; MALHI, H.; MOTT, J.L.; GORES, G.J.; Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr. Physiol.*, v.3, n.2,p.1-62, jun. 2013.

HARTY, M. W.; PAPA, E.F.; HUDDLESTON, H. M.; et al. Hepatic macrophages promote the neutrophil-dependent resolution of fibrosis in repairing cholestatic rat liver. *Surgery*. v.143, n.5, p. 667- 678, may. 2008.

HELLERBRAND, C.; Hepatic stellate cells- The pericytes in the liver. *Eur J. Physiol.*, v. 456, p. 775- 778, Jan. 2013.

HEMMANN, S.; GRAF, J.; RODERFELD, M.; et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis- a systematic review with special emphasis and anti-fibrotic strategies. *Journal Hepatology*, v.46, n.5, p.955-975, may. 2007.

HENDERSON, N.C.; IREDALE, J.P.; Liver fibrosis: Cellular mechanisms of progression and resolution. *Clinical Science*. v. 112, p. 265- 280, 2007.

HO, C-T.; LIN, R-Z.; CHEN, R-J.; et al. Liver- Cell Patterning Lab Chip: Mimicking the Morphology of Liver Lobule Tissue. v. 13, p.3578- 3587, May. 2013.

HOULIHAN, D.D.; NEWSOME, N.P.. Clinical advances in liver, pancreas and biliary tracts: Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology*,v.135, n.2,p.438-450, Aug.2008.

INAGAKI, Y.; HIGASHIYAMA, R.. Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatology Research*; v.42,p. 543–548,2012.

IREDALE, J.P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of Clinical Investigation*, v.117, p. 539 – 548, 2007.

ISSA, R.; WILLIAMS, E.; KENDALL. T.; ARTHUR, M.J.P.; REICHEN,J. BENYON, R.C.; IREDALE. J.P. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factor. *Gut*. v. 48 n.4, p. 548-557, 2001.

JOHANNSEN, D.L.; RAVUSSIN, E.; The Role of Mitochondria in Health and Disease. *Curr Opin Pharmacol*. v.9, n.6, p. 780- 786, dec 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 12. ed., p. 318-332, 2013.

KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology*, v. 161: III-XIII, p. 1-151, 2001.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; Mitochondrial and Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, p. 333- 343, may 2009.

KRAHENBUHL, S.; TALOS, C.; FISCHER, S.; et al. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology*, v.19, p. 471-479, 1994.

KRAUSS, S.; Mitochondrial: Structure and Role in Respiration. *Nature Publishing Group*. p. 1- 6, 2001.

KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v.61, n.2, p. 205-209, mar-apr.2010.

LANG, C.; BERARDI, S.; SCHAFER, D.; et al. Impaired ketogenesis is a major mechanism for disturbed hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term cholestasis and after relief of biliary obstruction, *J Hepatol* , v.37, p.564-571, 2002.

LIANG, H.; WARD, W.F.; PGC1- α : a key regulator of metabolism. *Adv Physiol Educ*.v.30, p. 145- 151, 2006.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S.; The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev and Rep*. v. 7, p. 269- 291, 2011.

LITONIN, D.; SOLOGUB, M.; SHI, Y.; et al. Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro, *J Biol Chem*. v.285, p.18129- 18133, 2010.

LU, K.V; JONG, K.A.; RAJASKARAN, A.K.; CLOUGHESY, T.F.; MISCHEL, P.S. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation* .v. 84, p. 8–20, 2004.

LUCKEY, S.W.; TAYLOR, M.; SAMPEY, B.P.; et al. 4-Hydroxynoneal Decreases Interleukin-6 Expression and Protein Production In Primary Rat Kupffer Cells by Inhibiting Nuclear KB Activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.302, n.1, p. 296-303, mar 2002.

MCFARLAND, R.; TURNBULL, D.M.; Batteries not included: diagnosis and management of mitochondria disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 265, p. 210-228, 2009.

MAILLARIX, R.J.; HARPER, M-E.; Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. v. 23, n.9, p. 451-456, may 2012.

MALARKEY, D.E.; JOHNSON, K.; RYAN, L.; et al. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic Pathology*, v.33, n.1, p. 27-34, Jan. 2005.

MALLAT, A.; LOTERSZTAJN, S., Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis.5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol.*, v. 305, p. C789- C799, Jul. 2013.

MEIRELLES, S.L.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cell*, v.26, n.9, p.2287-2299, sep 2008.

MISHRA, A.; PAUL, S.; SWARNAKAR, S. Downregulation of matrix metalloproteinases-9 by metatonin during prevention of alcohol – induced liver injury in mice. *Biochimie*, v. 93, n.5, p. 854-866, may 2011.

NAIK, E.; DIXIT, V.M.; Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. v. 208, n. 3, p. 417- 420, mar 2011.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A.; Mitochondria: In Sickness and In Health. *Cell*. v. 148, p. 1145- 1159, mar 2012.

OPIE, L.H.; The Metabolic Vicious Cycle in Heart Failure. *The Lancet*.v.364, n.9447, p.1733-1734.

PORADA, A.G.; ZANJANI, D.E.; PORADA, D.C.. Bone Marrow Stem Cells and Liver Regeneration. *Experimental Hematology*, v.38, n.7, p.574-80, Jul. 2010.

PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE; J.P.; et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.*,v.14, n.3, p.181-94, Mar 2014.

RANKIN, S.; Mesenchymal Stem Cells. *Chest Clinic*. v. 67, p. 565- 566, apr 2012.

ROBINTON, D. A.; DALEY G.Q; The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. v. 481, p. 295- 305, jan 2012.

ROLFE, D.F.S.; BRAND, M.D.; The Physiological Significance of Mitochondrial Proton Leak in Animal Cells and Tissue. *Bioscience Reports*. v. 17, n. 1, p. 9- 16, 1997.

ROLO, A. P.; OLIVEIRA, P. J.; MORENO, A. J.; et al. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy, *Toxicol Sci*. v. 57, p. 177-185, 2000.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W.; *Histologia: Texto e Atlas*, 6ª Ed., p.0-1000, 2012.

ROUSSET, S.; ALVES_GUERRA, M-C.; MOZO, J.; et al. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes*. v. 53, s. 1, p. S130- S135, fev 2004.

SAMEER, M.; BALASUBRAMANYAM, M.; MOHAN, V.. Stem Cells and Diabetes. *Current Science*, v. 91, n.9, p.1158-1165, nov. 2006.

SCARPULLA, R. C.; Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochim Biophys Acta* .v.1576, p. 1-14, 2002.

SHEN, X.; HONG, F.; NGUYEN, V.A.; et al. IL-10 Attenuates IFN- α Activated STAT1 In Liver: Involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Letters*. v.480, p. 132-136, 2000.

SHIMIZU, I.; SHIMAMOTO, N.; SAIKI, K.; et al. Lipid Peroxidation in Hepatic Fibrosis. *Biochemistry, Genetic and Molecular Biology*, cap 22, aug 2012.

SINHA, K.; Das J.; PAL, P.B.; Oxidative Stress: The Mitochondria- dependent and Mitochondria- independent Pathways of Apoptosis, *Arch Toxicol*, mar 2013.

ST-PIERRE, J.; DRORI, S.; ULDRY, M.; et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*. v.127, n.2, p. 397-408, oct 2006.

THOLE, A.A. *Análise da Expressão de TNF- α e CD133 no Pâncreas Após o Transplante de Células de Medula Óssea em Camundongos Hiperalimentados Durante a Lactação (Tese)* – Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2010.

TIAO, M.M.; LIN, T.K.; LIOU, C.W.; et al. Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury, *Apoptosis*, v. 14, p. 890-899, 2009.

VALLE, I.; BARRIENTOS-ÁLVARES, A.; ARZA, E.; et al. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidants defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*. v. 66, p. 562- 573, fev 2005.

VICKERS, A.E.M. Characterization of Hepatic Mitochondrial Injury Induced by Fatty Acid Oxidation Inhibitors. *Toxicologic Pathology*. v. 37, p. 78- 88, 2009.

VIEDAL, S.S.; VASSILIADIS, E.; BARASCUK, N.; et al. Matrixmetalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. *Liver International*, v.30, n.9, p.1293 – 1304, 2010.

WYNN, T.A.; BARRON L. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, v.30, n.3, p.245-257, 2010 Aug.

YAMAGUCHI, K.; ITOH, Y.; YOKOMIZO, C.; et al. Blockade of IL-6 signaling exacerbates liver injury and suppresses antiapoptotic gene expression in methionine choline- deficient diet- Fed db/db mice. *Laboratory Investigation*, v.91, p. 609-618, 2011.

ZHAN, S-S.; JIANG, J.X.; WU, J.; et al. Phagocytosis of Apoptotic Bodies by Hepatic Stellate Cells Induces NADPH Oxidase and Is Associated with Liver Fibrosis *in Vivo*. *Hepatology*. v.43, n.3, p. 435- 443, mar. 2006.

ZHENG, L.; CHU, J.; SHI, Y.; et al. Bone Marrow-derived Stem Cells Ameliorate Hepatic Fibrosis by Down-regulating Interleukin-17. *Cell & Bioscience*. v. 3, n.46, p. 1- 9.

APÊNDICE – Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats - artigo submetido

16/7/2014

ScholarOne Manuscripts

Biochemistry and Cell Biology

**Submission
Confirmation**

Thank you for submitting your manuscript to *Biochemistry and Cell Biology*.

Manuscript ID: bcb-2014-0105

Title: Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats

Authors: de Andrade, Daniela
de Carvalho, Simone
Pinheiro, Daphne
Thole, Alessandra
Moura, Anibal
Carvalho, Laís
Cortez, Erika

Date Submitted: 16-Jul-2014

Biochemistry and Cell Biology



Biochemistry and Cell Biology
 Biochimie et biologie cellulaire

Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Biochemistry and Cell Biology</i> |
| Manuscript ID: | Draft |
| Manuscript Type: | Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | de Andrade, Daniela; State University of Rio de Janeiro, Department of Histology and Embryology de Carvalho, Simone; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology Department Pinheiro, Daphne; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology Department Thole, Alessandra; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology Department Moura, Anibal; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Carvalho, Laís; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology Department Cortez, Erika; State University of Rio de Janeiro, Histology and Embriology Department |
| Keyword: | Liver fibrosis, Cholestasis, Mitochondrial bioenergetics, Mitochondria, Bone marrow mononuclear cells |
| | |

SCHOLARONE™
 Manuscripts

<http://mc06.manuscriptcentral.com/bcb-pubs>

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

Bone marrow mononuclear cell transplantation improves mitochondrial bioenergetics in the liver of cholestatic rats

Daniela Caldas de Andrade¹; Simone Nunes de Carvalho¹; Daphne Pinheiro¹; Alessandra Alves Thole¹;
Anibal Sanchez Moura²; Lais de Carvalho¹; Erika Afonso Costa Cortez¹

¹ Laboratory of Stem Cell Research, Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 3° andar, 20550-170 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Laboratory of Nutrition and Development Physiology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 5° andar, 20550-170 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Corresponding author: Erika Cortez; e-mail cortez.erika@gmail.com; telephone number: 55 21 28688025; FAX number: 55 21 28688411; Laboratory of Stem Cell Research, Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 3° andar, 20550-170 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

Mitochondrial dysfunction has been associated with liver cholestasis. Toxic bile salt accumulation leads to chronic injury with mitochondrial damage, ROS increase and apoptosis, resulting in liver dysfunction. This study aimed to analyze mitochondrial bioenergetics in rats with hepatic fibrosis induced by bile duct ligation (BDL) after BMMNC transplantation. Livers were collected from normal rats, fibrotic rats after 14 and 21 days of BDL (F14d and F21d) and rats that received BMMNC at 14 days of BDL, analyzed after 7 days. F21d demonstrated increased collagen I content and consequently decrease after BMMNC transplantation. Both F14d and F21d had significantly reduced mitochondrial oxidation capacity and increased mitochondrial uncoupling, which were restored to levels similar to those of normal group after BMMNC transplantation. In addition, F21d had a significantly increase of UCP2, and reduced PGC-1 α content. However, after BMMNC transplantation both proteins returned to levels similar to normal group. Moreover, F14d had a significantly increase in 4-HNE content compared to normal group, but after BMMNC transplantation 4-HNE content significantly reduced, suggesting oxidative stress reduction. Therefore, BMMNC transplantation has a positive effect on hepatic mitochondrial bioenergetics of cholestatic rats, increasing oxidative capacity and reducing oxidative stress, which, in turn, contribute to liver function recover.

Keywords: liver fibrosis, cholestasis, mitochondrial bioenergetics, mitochondria, bone marrow mononuclear cells.

Introduction

Liver fibrosis is characterized by fibrogenesis dysregulation as a chronic inflammatory process leading to extracellular matrix accumulation and hepatic architecture disruption (Veidal *et al.*, 2010; Mallat & Lotersztajn, 2013). Bile duct ligation (BDL), an experimental model of cholestasis, causes toxic bile retention in the liver with severe biochemical and structural changes (Carvalho *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012), in which the overall mitochondrial function is impaired, resulting in a marked metabolic disorder, characterized by reduced carbohydrate and fatty acid oxidation. Therefore, mitochondria are relevant organelles in hepatic cholestasis, involved in different stages of the disease progression (Grattagliano *et al.*, 2011; Arduini *et al.*, 2011).

During cholestasis onset, the hydrophobicity of bile acids components plays a key role in the cytotoxic action on hepatocytes (Attili *et al.*, 1986; Malhi *et al.*, 2006). Some of the adverse effects could be related to the disturbance of the mitochondrial membrane, changing its fluidity and potential, and also increasing reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis (Krahenbuhl *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004; Arduini *et al.*, 2012). *In vitro* incubation of mitochondria with bile acids decreased mitochondrial oxidation capacity, as also demonstrated *in vivo* (Koyama *et al.*, 1980; Rolo *et al.*, 2000). In addition, bile acids exert a direct effect on mitochondrial uncoupled respiration, modulating uncoupling proteins (UCP), presented in the inner mitochondrial membrane (Enochsson *et al.*, 2010).

Mitochondrial mass and function need to be regulated due to its vital role in energy production, metabolism and signaling. The active process of mitochondrial is coordinated through several transcription factors, and the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 alpha (PGC-1 α) is one of the most important, promoting the transcription of mitochondrial transcription factor A (TFAM) that controls mitochondrial DNA replication (Falkenberg *et al.*, 2002; Scarpulla, 2002; Litonin *et al.*, 2010). BDL reduces TFAM levels, indicating that mitochondrial biogenesis is impaired early in the development of cholestasis (Tiao *et al.*, 2009). Therefore, mitochondrial damage is not accompanied by a proper biogenesis to recover mitochondrial function.

Non-functional mitochondria are important sources of ROS, which recruit and activate inflammatory cells, including Kupffer cells that produces pro-fibrogenic cytokines, inducing parenchyma cells apoptosis (Kupai *et al.*, 2010; Byun and Joeng, 2011; Mishra *et al.*, 2011). TGF- β directly activates hepatic stellate cells, promoting extracellular matrix production that hinders the movement of nutrients and

oxygen to the hepatocytes, leading to apoptosis (Forbes and Parola, 2011; Carvalho *et al.*, 2013a; Pollicoro *et al.*, 2014).

Currently, the only effective treatment for cirrhosis is liver transplantation. However, the shortage of organs, among other factors, leads to the need for developing new therapies (Porada *et al.*, 2010). Our group has recently demonstrated that bone marrow mononuclear cells (BMMNC) transplantation on rats with liver fibrosis restores the extracellular matrix, leading to fibrosis resolution and hepatic function normalization (Carvalho *et al.*, 2010; 2013a; 2013b). On this way, the currently work aimed to better understand the mechanisms by which BMMNC transplantation has a positive effect on cholestasis investigating its role on liver mitochondrial bioenergetics.

Materials and Methods

Hepatic fibrosis induction and experimental groups

To induce hepatic fibrosis, three- month old male Wistar rats (250 - 270g) were anesthetized with halothane and the bile duct ligation (BDL) followed by resection was carried out. BMMNC were isolated from the tibias and femurs of two- month old healthy male Wistar rats, sacrificed in a CO₂ chamber, as described by Carvalho *et al.* (2010). Briefly, the medullar cavities were exposed and washed 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 and centrifugation at 2.000 rpm. The mononuclear cells interface was collected and transplanted via jugular vein in rats with 14 days fibrosis. The animals were divided into four groups (n=8): normal animals, animals with hepatic fibrosis after 14 and 21 days of BDL (F14d and F21d groups, respectively), and animals with hepatic fibrosis after 14 days of BDL which received 10⁷ BMMNC via jugular vein and were sacrificed after 7 days of transplantation (F14d+7d BMMNC). All animals used in this study were submitted to protocols approved by the Animal Experiments Committee in accordance with the standard guidelines on animal experimentation, received water and standard food ad libitum and were sacrificed in CO₂ chamber.

High-Resolution Respirometry

We used the high-resolution respirometry protocol according to Cortez *et al.* (2012). Immediately after sacrifice, liver fragments were mechanically permeabilized by using sharpened forceps. After that, the tissue were transferred into vessels with cooled (in ice) Mitochondrial Respiration Medium, MIR05 (in mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurine 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sucrose 110 and BSA 1g/L, pH 7.1 adjusted at 25°C) and incubated at mild stirring for 2 min. After, the tissue was weighted and 5 mg was used per chamber. The respiratory rates of liver were measured with the Oroboros 2k-Oxygraph (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) in 2 ml of MIR05 at 37°C with continuous stirring. Before adding the tissue into the chamber, wet weight measurements were taken and a sample of 5 mg was used per chamber. Oxygen limitation was avoided by maintaining oxygen levels above 400mM O₂ in the chamber. Datlab software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition and analysis. Oxygen consumption rates were expressed as pmol of O₂ • s⁻¹•mg wet weight⁻¹. Studies were performed with two independent sets of substrates. In the carbohydrate protocol, substrate combinations were used for electron flow through CI and CII (in mM): glutamate, 10; malate, 2; and succinate, 10. In the fatty acid, protocol respiration was measured with (in mM): palmitoyl-l-carnitine, 0.02 and malate, 2. Respiratory parameters were defined as follows: maximally ADP (5 mM)-stimulated respiration rates (State 3), and respiration rates in the absence of ADP phosphorylation and measured in the presence of 1 µg/ml oligomycin (State 4). From the respiratory fluxes obtained during the substrate titration protocol, respiratory control ratio (RCR) was calculated for State 3/State 4.

Western Blotting analysis of UCP-2, PGC-1 α , 4-HNE and Collagen I.

Samples from experimental groups (100 mg) were incubated in Lysis Buffer (1% triton X 100, 100 mM Tris, 100 mM sodium pyrophosphate, 10 mM EDTA, 10 mM sodium orthovanadate and protease inhibitors PMSF and aprotinin), and mechanically dissociated before sonication. The protein concentration in the sample was measured using BCA protein assay kit (Thermo Scientific kit). Protein samples were solubilized in Laemmli sample buffer (Tris-HCL 50mM; pH 6.8; SDS 1%; 2 β -mercaptoetanol 5%; glycerol 10; bromophenol blue 0.001%) for 3 minutes at 100°C and frozen before

undergoing to SDS-PAGE. Equal quantities of protein (30 μ g) were loaded onto 12 % polyacrylamide gel along with pre-stained molecular weight standards (Full Range Rainbow; Amersham Biosciences, UK Limited). After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Hybond P; Amersham Biosciences, UK Limited). The membranes were blocked with Tween-TBS (10% Tween 20) containing 5% nonfat dry milk for 1 h and incubated with the appropriate antibodies overnight and transferred to PVDF membranes (1h, 15V). Membranes were blocked for 1 hours in phosphate buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS) and 5% albumin from bovine serum (BSA). Then, membranes were incubated with polyclonal primary antibody anti- UCP-2 (Santa Cruz Biotechnology), PGC-1 α (Santa Cruz Biotechnology) , collagen I (Santa Cruz Biotechnology), 4-HNE (Abcam) or β -actin (Sigma-Aldrich) using dilution 1: 1.000, followed by washing and incubation with biotinylated anti-goat secondary antibody (Life Technologies) and finally streptavidin-peroxidase (Life Technologies), both 1: 5 000 in TBS. Membranes were then incubated with substrate for enhanced chemiluminescence (ECL) from Thermo containing hydrogen peroxide for 5 min and revealed in ChemiDoc MP (Bio Rad). The bands were then scanned, and densitometry of digitalized images was performed in the image J software (NIH, Bethesda, MS, USA). All proteins were normalized to the internal control, β -actin, during analysis.

Ultrastructural Mitochondria Analysis

Liver fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Cacodylate buffer, pH 7.2, for 1 hour at room temperature. Then, samples were washed with Cacodylate buffer and post fixed in 1 % Osmium tetroxide. Afterwards, samples were dehydrated in acetone and embedded in Epon. The ultrafine sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. The mitochondria of hepatocytes were analysis in Carl Zeiss Tem 906 or Jeol Jem 1011 transmission electron microscopes.

Statistics

Data were analyzed using one-way analysis of variance with Holm-Sidak post-test for multiple comparisons, with $P \leq 0.05$ being considered statistically significant. Data are presented as mean \pm SE.

Results

Liver Mitochondrial respiration

F14d and F21d groups showed liver mitochondrial impairment, with a significantly reduction in the maximum ADP-stimulate respiratory rates (State 3) in both carbohydrates and fatty acids oxidation protocols when compared to normal rats. However, BMMNC transplantation promoted a significantly increase in state 3 respiration (fig 1A and B). Furthermore, the RCR decreased significantly in both F14d and F21d groups, indicating mitochondrial uncoupling, but after BMMNC transplantation, it was observed that RCR increased significantly to levels similar to those of normal group (fig 1C and D).

Western Blotting analysis

Collagen I and UCP2 contents were significantly increased in F21d group (1.35 ± 0.12 and 1.51 ± 0.22 , respectively) compared to normal group (0.88 ± 0.07 and 0.99 ± 0.04 , respectively). However, it was observed that after BMMNC transplantation both proteins content (0.71 ± 0.05 and 0.75 ± 0.08 , respectively) significantly reduced to levels similar to normal rats (fig. 2 D and A).

PGC-1 α content was significantly reduced in F21d group (0.99 ± 0.08) compared to the normal group (1.37 ± 0.07), but after BMMNC transplantation it was significantly increased (1.53 ± 0.19) (fig. 2B).

4-HNE content, indicative of lipid peroxidation, was increased significantly in F14d group (1.48 ± 0.05) compared to normal group (1.04 ± 0.05). However, after BMMNC transplantation it was significantly reduced (0.89 ± 0.12) compared to both F14d and F21d (1.29 ± 0.08) (fig. 2C)

Ultrastructural Mitochondria Analysis

The normal group showed preserved mitochondria double membrane and highly electron density mitochondrial matrix. However, mitochondria from F14d group presented a decreased matrix electron density and the loss of mitochondrial membrane integrity. F21d group also showed mitochondrial damage, with membrane disruption and consequently mitochondrial matrix extravasation to the

cytoplasm. Nevertheless, after BMMNC transplantation, hepatocytes recovered mitochondrial membrane integrity, and a little recover of mitochondrial matrix electron density (fig. 3).

Discussion

Our group has recently showed that BMMNC transplantation promotes apoptosis of hepatic stellate cells, elevates MMPs production and activity, and decreases TIMP expression, thereby contributing to liver fibrosis reduction in rats with bile duct ligation (Carvalho *et al.*; 2013a and 2013b). Corroborating these previous studies, our present data showed that BMMNC transplantation significantly reduced collagen I content in cholestatic rats. It is known that liver fibrosis is characterized by excessive extracellular matrix deposition, and collagen I is one of the main components of this modified matrix. The chronic liver injury resulting from the retention of bile salts in the liver parenchyma promotes the activation of inflammatory cells, hepatocyte apoptosis and ROS production, contributing to the activation of hepatic stellate cells, the main fibrogenic cell. In order to better understand the mechanisms by which BMMNC transplantation contributes to the resolution of fibrosis and restoration of liver function in cholestasis induced by bile duct ligation (BDL), we analyzed, for the first time, the effects of BMMNC transplantation on mitochondria ultrastructural, biochemical and physiological changes. In addition to ATP production, mitochondria play several cellular functions as the biosynthesis of non-essentials amino acids, hormones and DNA precursors, and also participating in signaling pathways of cell death and survival. Therefore, mitochondrial dysfunction can be manifested in different ways and is present in several acute and chronic diseases processes such as diabetes, cardiomyopathies, renal and hepatic fibrosis (Mitchell *et al.*, 2009; Roede and Jones, 2010; Arduini. *et al.*, 2012, Guicciardi *et al.*, 2013).

Mitochondrial dysfunction is accompanied by decreased ATP synthesis, increased production of ROS and uncoupling respiratory proteins, and also increased apoptosis (Rousset *et al.*, 2004; Roede and Jones, 2010). In the present study, liver fibrosis was induced by BDL, an experimental model of cholestasis, which maintains chronically hepatic injury. The modification of the mitochondrial membrane occurs as a result of the hydrophobic bile salts toxic components incorporation, retained in the hepatic parenchyma due to BDL, which promotes mitochondrial metabolism alterations, such as β -oxidation reduction, ketones synthesis and, finally, energy depletion by decreased ATP synthesis (Lang *et al.*, 2001; Arduini *et al.*, 2011). These results were confirmed in this study. However, our data demonstrated that BMMNC

transplantation was able to restore mitochondrial function, as showed by increased carbohydrate and fatty acid oxidation capacity.

Besides the reduction of mitochondrial oxidative capacity in animals with liver fibrosis, our results also demonstrated a reduced PGC-1 α content. It is known that mitochondrial biogenesis must meet the specific energy needs of the cell and is coordinated through the activity of several transcription factors to the nuclear level (Scarpulla, 2002). The reduced expression of PGC-1 α in mice is usually accompanied by a reduced ability to oxidize fatty acids (Fink and Kelly, 2006). In addition, increased PGC-1 α can be promoted by mitochondrial dysfunction as a compensatory mechanism (Tiao *et al.*, 2009). However, chronic oxidative stress causes mitochondrial biogenesis reduction, as observed in other studies (Scarpulla, 2002; Liang and Ward, 2006; Austin and St-Pierre, 2012). Our data showed a reduced PGC-1 α content in F21d group. However, after BMMNC transplantation PGC-1 α reached levels similar to those of normal rats, indicating a positive effect on mitochondrial biogenesis, as also observed for mitochondrial function. PGC-1 α plays a central role in the control of oxidative stress because it controls the expression of antioxidant enzymes. Thus, its increase raises mitochondrial function and reduces ROS accumulation, ensuring overall positive impact on oxidative metabolism (Austin and St-Pierre, 2012), corroborating our data.

Our results also showed that the BMMNC transplantation was able to significantly reduce mitochondrial uncoupling, as indicated by both the increase in the RCR and the decreased UCP2 content. It is known that the return of protons into the mitochondrial matrix through UCPs physiologically contributes to the neutralization of ROS that are naturally generated by OXPHOS. Under oxidative stress conditions, consistent with chronic inflammation, in which occurs increase of ROS synthesis, there is also the increase of UCPs content, increasing the flow of H⁺, as an antioxidant strategy because it reduces the proton gradient force, limiting ROS production in cost of the ATP synthesis depletion (Enochsson *et al.*, 2009; Azzu *et al.*, 2010; Naik and Dixit, 2011; Mailloux *et al.*, 2012).

Our study also demonstrated a significant reduction in the content of 4-HNE, a product of lipid peroxidation, after transplantation of BMMNC. Hepatic fibrosis leads to an increased ROS production by both inflammatory cells and injured hepatocytes. It is known that ROS, at low concentrations, play an important role in the modulation of signaling pathways, cell proliferation and are also essential for cell development (Bartosz, 2008; Nunnari and Suomalaineu, 2012). However, the oxidative damage is associated with the balance disruption, being incompatible with cell viability (Sinha *et al.*, 2013).

Mitochondria play a key role in liver fibrosis progression, because it produces ROS that regulate the inflammatory cytokines expression and promote cell death, leading to maintenance of the pathological process (Higuchi *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2004; Tiao *et al.*, 2009). ROS also induce lipid peroxidation of membrane phospholipids, which causes hepatocyte death and synthesis of apoptotic body, and consequently activate fibrogenic cells (Zhan *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2010; Shimizu *et al.*, 2012). The reduced 4-HNE content after BMMNC transplantation is an important indicator of oxidative stress reduction. In addition, 4-HNE reduces the production of IL-6 by Kupffer cells, which can affect liver regeneration, since IL-6 promotes hepatocytes mitogenesis via STAT3 (Luckey *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2011; Cong *et al.*, 2012). Therefore, the reduction of 4-HNE content not only indicates the reduction of oxidative stress but also shows a possible mechanism for the increased proliferation of liver cells discussed in previous work by our group (Carvalho *et al.*, 2013a).

Other works have shown loss of mitochondrial matrix electron density associated with mitochondrial dysfunction (Vickers, 2009). Our ultrastructural analysis of hepatic mitochondria demonstrated mitochondrial damage in F14d and F21d groups, which can be explained by the change of mitochondrial membrane components, since there is incorporation of bile hydrophobic salts components into the mitochondrial membrane with consequent loss of phospholipids (Arduini *et al.*, 2012). Moreover, these groups showed disrupted mitochondrial matrix, consistent with above results, representative of mitochondrial dysfunction. However, after BMMNC transplantation it was observed a recovery of the mitochondrial ultrastructure, corroborating the physiological recovery observed.

Thus, the increase in the carbohydrate and fatty acids oxidation capacity, mitochondrial biogenesis and decreased mitochondrial uncoupling that occurred after BMMNC transplantation, indicate the recovery of hepatic mitochondrial energy metabolism and the contribution of these cells to the restoration of mitochondrial function and reduction of oxidative stress condition, pointing to a reduction in the inflammatory process. This can be explained by the paracrine effect caused by these cells that release cytokines and anti-inflammatory factors such as IL-10, able to block the synthesis of inflammatory cytokines by macrophages (Shen *et al.*, 2000; Wynn and Barron, 2010; Cong *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013). Furthermore, we demonstrated that BMMNC transplantation increases a specific macrophage population of extra-hepatic origin CD11b⁺, which synthesizes MMP-13. This metalloproteinase has been pointed as one of the main antifibrotic molecules in the regenerating liver (Carvalho *et al.*, 2013b).

In conclusion, BMMNC transplantation is able to promote the restoration of energy metabolism and mitochondrial ultrastructure in the liver of rats with hepatic fibrosis induced by BDL. It is well known that hepatocyte function is highly dependent of mitochondrial metabolism. Once BMMNC is directly involved with restoration of liver function, understanding mitochondrial response after cell therapy is paramount to achieve advanced strategies aiming resolution of liver fibrosis.

Acknowledgements

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

- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Vina J, Monsalve M, Sastre J. 2011. Mitochondrial Biogenesis Fails in Secondary Biliary Cirrhosis in Rats Leading to Mitochondrial DNA Depletion and Deletions, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 301(1): G119-27.
- Arduini A, Serviddio G, Tormos AM, Monsalve M, Sastre J. 2012. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. *Front Biosci*; 4: 2233- 2252.
- Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. 1986. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids, *Med Hypotheses*;19: 57-69.
- Austin S, St-Pierre J. 2012. PGC-1 α and Mitochondrial Metabolism- Emerging Concepts and Relevance in Ageing and Neurodegenerative Disorders. *Journal of Cell Science*; 125(21): 4963- 4971.
- Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS, Brand MD. 2010. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*. ;1797(6-7):785-91.
- Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? 2009. *Biochem Pharmacol*. 15;77(8):1303-15.
- Byun SJ and Joeng IW. 2010. Involvement of Hepatic Innate Immunity in Alcoholic Liver Disease. *Immune Network*; 10 (6): 181-187.

- Carvalho SN, Lira DC, Oliveira GP, Thole AA, Stumbo AC, Caetano CE, Marques RG, Carvalho L. 2010. Decreased collagen types I and IV, laminin, CK-19 and α -SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. *Histochem Cell Biol*; 134(5): 493-502.
- Carvalho SN, Lira DC, Cortez EAC, Andrade DC, Thole AA, Stumbo AC, Carvalho L. 2013a. Bone marrow cell transplantation is associated with fibrogenic cells apoptosis during hepatic regeneration in cholestatic rats. *Biochemistry and Cell Biology*; 2: 1-7.
- Carvalho SN, Helal-Neto E, Andrade DC, Cortez EAC, Thole AA, Barja-Fidalgo C, Carvalho L. 2013b. Bone marrow mononuclear cell transplantation increases metalloproteinases -9 and -13 and decreases TIMPs -1 and -2 expression in the liver of cholestatic rats. *Cells Tissues Organs*; 198(2):139-48.
- Cong M, Iwaisako K, Jiang C, Kisseleva T. 2012. Cell signals influencing hepatic fibrosis. *Int J Hepatol* ;2012:158547.
- Cortez E, Neves FA, Bernardo AF, Stumbo AC, Carvalho L, Garcia-Souza E, Sichieri R, Moura AS. 2012. Lymphocytes mitochondrial physiology as biomarker of energy metabolism during fasted and fed conditions. *ScientificWorldJournal*; 2012: 629326.
- Enochsson L, Isaksson B, Strommer L, Erlanson-Albertsson C, Permert J. 2010. Bile duct obstruction is associated with early postoperative upregulation of liver uncoupling protein-2 and reduced circulating glucose concentration in the rat. *Nutrition* ; 26 (4): 405-410.
- Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson GN, Gustafsson CM. 2002. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*; 31(3): 289-294.
- Fang Y, Han SI, Mitchell C, Gupta S, Studer E, Grant S, Hylemon PB, Dent P. 2004. Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology*; 40: 961-971.
- Fink BN, Kelly DP. 2006. PGC-1 coactivators: Inducible Regulators of Energy Metabolism in Health and Disease. *The Journal of Clinical Investigation*; 116 (3): 615-622.
- Forbes SJ, Parola M. 2011. Liver fibrogenic cells. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* ; 25(2): 207-217.
- Grattagliano I, Russmann S, Diogo CV, Bonfrate L, Oliveira PJ, Wang DQ, Portincasa P. 2011. Mitochondria in Chronic Liver Disease. *Curr Drug Targets*; 12(6):879-893.
- Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. 2013. Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr. Physiol.*; 3 (2): 1-62. doi:10.1002/cphy.c120020.

- Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schröder K, Brandes RP, Devaraj S, Török NJ. 2012. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med.* 15;53(2):289-96.
- Higuchi H, Miyoshi H, Bronk SF, Zhang H, Dean N, Gores GJ. 2001. Bid antisense attenuates bile acid-induced apoptosis and cholestatic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*; 299:866-873.
- Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S and Reichen J. 1994. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. *Hepatology*, 19(2): 471-479.
- Koyama K, Ito K, Ouchi K, Sato T. 1980. Mitochondrial function of rat liver in biliary obstruction, *Tohoku J Exp Med*;131: 59-69.
- Kupai K, Szucs G, Cseh S, Csonka C, Csont T, Ferdindy B. 2010. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 61(2): 205-209.
- Lang C, Schafer M, Serra D, Hegardt F, Krahenbuhl L, Krahenbuhl S. 2001. Impaired hepatic fatty acid oxidation in rats with short-term cholestasis: characterization and mechanism, *J Lipid Res*;42: 22-30.
- Liang H, Ward WF. 2006. PGC1- α : a key regulator of metabolism. *Adv Physiol Educ.*;30:145-151.
- Lin TK, Huang LT, Huang YH, Tiao MM, Tang KS, Liou CW. 2012. The effect of the red wine polyphenol resveratrol on a rat model of biliary obstructed cholestasis: involvement of anti-apoptotic signalling, mitochondrial biogenesis and the induction of autophagy. *Apoptosis.*; 17(8): 871-879.
- Litonin D, Sologub M, Shi Y, Savkina M, Anikin M, Falkenberg M, Gustafsson CM and Temiakov D. 2010. Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro, *J Biol Chem* ; 285 (24): 18129- 18133.
- Luckey SW, Taylor M, Sampey BP, Scheinman RI, Petersen DR. 2002. 4-hydroxynonenal decreases interleukin-6 expression and protein production in primary rat Kupffer cells by inhibiting nuclear factor-kappaB activation. *J Pharmacol Exp Ther.*;302(1):296-303.
- Mailloux RJ, Harper ME. 2012. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab.* ;23(9):451-8.
- Mallat A and Lotersztajn S. 2013. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis.5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*; 305: C789- C799.

- Malhi H, Gores GJ and Lemasters JJ. 2006. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*; 43 (2 Suppl 1): S31-44.
- Mitchell C, Robin MA, Mayeuf A, Mahrouf-Yorgov M, Mansouri A, Hamard M, Couton D, Fromenty B, Gilgenkrantz H. 2009. Protection against hepatocyte mitochondrial dysfunction delays fibrosis progression in mice. *Am J Pathol.* ;175(5):1929-37.
- Mishra A, Paul S, Swarnakar, S. 2011. Downregulation of matrix metalloproteinases-9 by metatoinin during prevention of alcohol – induced liver injury in mice. *Biochimie*; 93(5): 854-866.
- Naik E, Dixit VM. 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production; 208(3):417- 420.
- Nunnari J, Suomalainen A. 2012. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*.;148(6):1145-59.
- Poli G. 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* ; 21 (3): 49-98.
- Pollicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* ; 14(3): p.181-94.
- Porada AG, Zanjani DE, Pórada DC. 2010. Bone Marrow Stem Cells and Liver Regeneration. *Experimental Hematology*; 38(7):574-80.
- Roede JR, Jones DP. 2010. Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environ Mol Mutagen.*;51(5):380-90.
- Rolo AP, Oliveira PJ, Moreno AJ, Palmeira CM. 2000. Bile acids affect liver mitochondrial bioenergetics: possible relevance for cholestasis therapy. *Toxicol Sci*; 57: 177-185.
- Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* ;53 Suppl 1:S130-5.
- Scarpulla RC. 2002. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* ; 1576 (1-2): 1-14.
- Shen X, Hong F, Nguyen VA, Gao B. 2000. IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3. *FEBS Lett.* ;480(2-3):132-6.
- Shimizu I, Shimamoto N, Saiki K, Furujo M, Osawa K. 2012. Lipid Peroxidation in Hepatic Fibrosis. *Biochemistry, Genetic and Molecular Biology*, XXII.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* ;87(7):1157-80.

- Tiao MM, Lin TK, Liou CW, Wang PW, Chen JB, Kuo FY, Huang CC, Chou YM, Chuang JH. 2009. Early transcriptional deregulation of hepatic mitochondrial biogenesis and its consequent effects on murine cholestatic liver injury. *Apoptosis*; 14(7): 890-899.
- Veidal SS, Vassiliadis E, Barascuk N, Zhang C, Silvestre ST, Klickstein L, Larsen MR, Ovist P, Christensen C, Vainer B, Varsdal MA. 2010. Matrixmetalloproteinase-9-mediated type III collagen degradation as a novel serological biochemical marker for liver fibrogenesis. *Liver International*; 30(9): 1293-1304.
- Vickers AE. 2009. Characterization of hepatic mitochondrial injury induced by fatty acid oxidation inhibitors. *Toxicol Pathol.* ;37(1):78-88.
- Wynn TA, Barron L. 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* ;30(3):245-57.
- Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Umemura A, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. 2011. Blockade of IL-6 signaling exacerbates liver injury and suppresses antiapoptotic gene expression in methionine choline-deficient diet-fed db/db mice. *Lab Invest.* ;91(4):609-18.
- Zhang Y, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Bouscarel B, Rojkind M, Hyodo I, Matsuzaki Y. 2006. Involvement of integrin-linked kinase in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepatology.* ;44(3):612-22.
- Zheng L, Chu J, Shi Y, Zhou X, Tan L, Li Q, Cui L, Han Z, Han Y, Fan D. 2013. Bone marrow-derived stem cells ameliorate hepatic fibrosis by down-regulating interleukin-17. *Cell Biosci.*; 3: 46.

Legends:

Figure 1: High resolution Respirometry of liver from rats with cholestasis. (A) Maximal ADP-stimulated respiratory rates (State 3) with substrates related to carbohydrate oxidation (CHO). (B) Maximal ADP-stimulated respiratory rates (State 3) with substrates related to fatty acid oxidation. (C and D) Respiratory control ratio (RCR), calculated as State 3/ State 4 ratios for CHO and fatty acids oxidation, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM. "a" represents significant difference compared to the control group. "b" represents significant difference compared to F14d +7d BMMNC group. N = 8/group.

Figure 2: Western blotting analysis of the total content of (A) UCP2, (B) PGC-1 α (C) 4 - HNE and (D) collagen I in livers of rats with cholestasis. Data are expressed as mean \pm SEM. "a" represents significant difference compared to the control group, "b" represents significant difference compared to F14d +7 d BMMNC group. N = 8/group.

Figure 3: Ultrastructural analysis of liver mitochondria in rats with cholestasis. In the normal group (A) (20000X, 60000X), the analysis indicated well preserved mitochondria matrix (MM) and membranes. F14d group (B) (25000x; 80000X) showed disruption of mitochondrial membranes and loss of MM electron density (arrow), which was also observed in F21d group (C) (21560X, 60000X) (asterisk). However, after BMMNC transplantation (D) (25000x; 80000X) it was observed the recovery of mitochondrial membrane integrity (arrowhead).

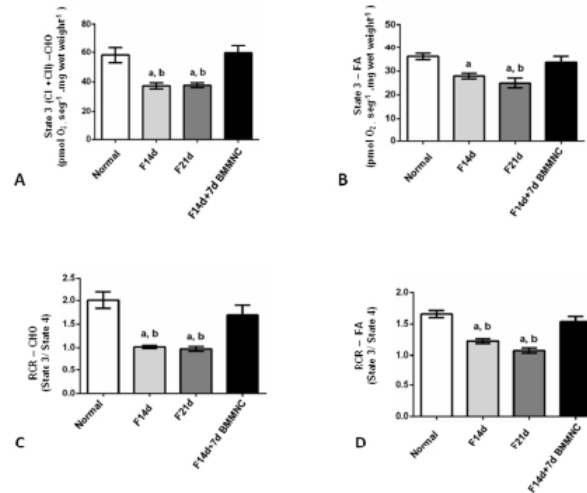


Figure 1: High resolution Respirometry of liver from rats with cholestasis. (A) Maximal ADP-stimulated respiratory rates (State 3) with substrates related to carbohydrate oxidation (CHO). (B) Maximal ADP-stimulated respiratory rates (State 3) with substrates related to fatty acid oxidation. (C and D) Respiratory control ratio (RCR), calculated as State 3/ State 4 ratios for CHO and fatty acids oxidation, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM. "a" represents significant difference compared to the control group, "b" represents significant difference compared to F14d + 7d BMMNC group. N = 8/group.
254x190mm (96 x 96 DPI)

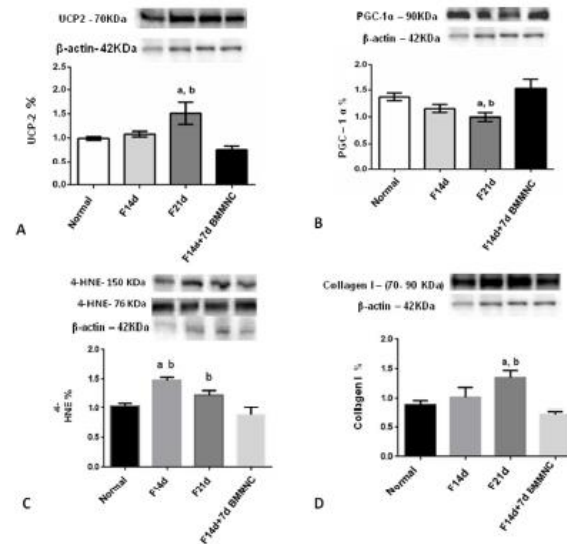


Figure 2: Western blotting analysis of the total content of (A) UCP2, (B) PGC-1 α (C) 4 - HNE and (D) collagen I in livers of rats with cholestasis. Data are expressed as mean \pm SEM. "a" represents significant difference compared to the control group, "b" represents significant difference compared to F14d +7 d BMMNC group. N = 8/group.
254x190mm (96 x 96 DPI)

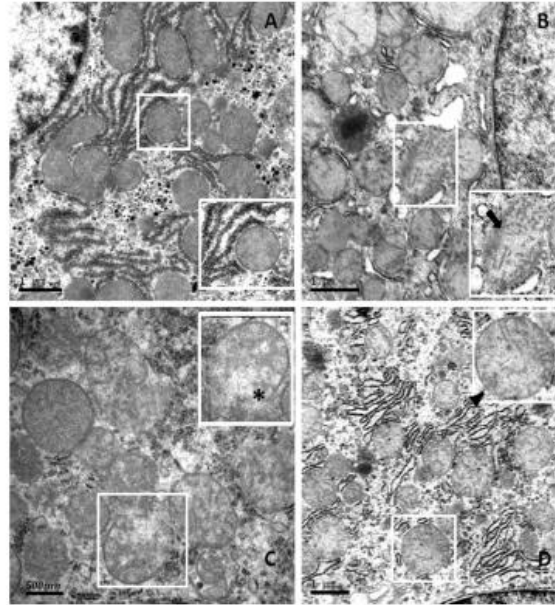


Figure 3: Ultrastructural analysis of liver mitochondria in rats with cholestasis. In the normal group (A) (20000X, 60000X), the analysis indicated well preserved mitochondria matrix (MM) and membranes. F14d group (B) (25000x; 80000X) showed disruption of mitochondrial membranes and loss of MM electron density (arrow), which was also observed in F21d group (C) (21560X, 60000X) (asterisk). However, after BMMNC transplantation (D) (25000x; 80000X) it was observed the recovery of mitochondrial membrane integrity (arrowhead).

254x190mm (96 x 96 DPI)