ADRIANA RIBEIRO LEITE

**INDUÇÃO “IN VITRO” DA TRANS-DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
OVAIS HEPÁTICAS EM ESTRUTURAS SEMELHANTES ÀS
ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**Tese apresentada ao Departamento de Clínica
Médica da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto

SÃO PAULO

2006

Esta tese está de acordo com:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

*“Não é o que você pensa que é!
Não podemos pensar sobre a presença
nem a mente pode entendê-la.
Compreender a presença é estar presente...”*

Eckhart Tolle

*“Nasceste no lugar mais indicado aos
ensinamentos de que precisas
e no grupo familiar que mais se te aconselha
ao currículo de lições...”*

Emmanuel

Dedico...

*Aos meus pais e irmãos, que
sempre me apoiaram incondicionalmente
em todos os meus sonhos e projetos de vida .*

*À minha querida filha Juliana ,
pelo seu amor sempre
tão presente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, esperança e sua benção de cada dia.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella Neto pela oportunidade, confiança, apoio constante ao meu aprimoramento profissional e principalmente pelo incentivo e compreensão nos momentos difíceis, o meu respeito, admiração e sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Corrêa Giannella pela importante contribuição, motivação e participação constante no desenvolvimento de todo este trabalho, e principalmente pela amizade sempre presente.

Ao Dr. José Tadeu Stefano pelo apoio constante, sincera amizade e incentivo.

À Dra. Karla Melo pelo incentivo, contribuição importante na fase de qualificação para esta tese, além de sua sincera amizade.

Ao Dr. Jean Jorge S. Souza, pela contribuição no levantamento

bibliográfico.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan pela importante contribuição nas técnicas de anatomia patológica.

À bióloga Maria Angela H. Zanella Fortes e à biomédica Ana Mercedes S. Cavaleiro, o meu agradecimento pelos auxílios nas técnicas de biologia molecular.

À secretária Norisa Amadeo Herrera, pela solução de problemas burocráticos relacionados ao projeto e por sua amizade sempre presente.

A todos os técnicos e amigos do Laboratório de Investigação Médica (LIM25), que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesta pesquisa possibilitando sua conclusão, meus sinceros agradecimentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro concedido.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xx
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Diabetes Melito	01
1.2. As Ilhotas Pancreáticas	05
1.3. O Transplante de Ilhotas Pancreáticas	08
1.4. As Células Tronco ou “Stem Cells”	11
1.4.1. Classificação das Células Tronco	11
1.5. A Célula Oval Hepática	16
1.6. Origem das Células Ovais Hepáticas	17
2. OBJETIVOS	21
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
3.1. Deliamento Experimental	24
3.2. Fluxograma dos Experimentos	25
3.3. Indução da Proliferação das Células Ovais Hepáticas.	26
3.4. Análise Anátomo-patológica	27
3.5. Isolamento das Células Ovais Hepáticas	29

3.5.1. Separação das Células por Centrifugação	29
3.5.2. Separação das Células Ovais Hepáticas por Gradiente de Ficoll	29
3.5.3. Isolamento das Células Ovais Hepáticas através de Esferas Magnéticas Dynalbeads® Thy1.1	30
3.5.3.1. Preparação das Esferas Magnéticas para Utilização	31
3.5.3.2. Incubação das Esferas Magnéticas Dynalbeads® Thy1.1 às Células Ovais Hepáticas	31
3.6. Caracterização das Células Ovais Hepáticas isoladas e purificadas	32
3.7. Extração de RNA Total	33
3.7.1. Visualização do RNA Total Extraído Análise por PCR	34
3.7.2. Quantificação do RNA Extraído	35
3.8. Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)	37
3.8.1. Padronização dos Genes	37
3.8.1.2. Gradiente de Temperatura	40
3.8.1.3. Curva de Ciclagem	40
3.9. Análise por PCR	42
3.10. Análise Estatística	44

4. RESULTADOS	45
4.1. Confirmação da Proliferação das Células Ovais Hepáticas	45
4.2. Confirmação Genética da Proliferação das Células Ovais Hepáticas	45
4.3. Caracterização das Células Ovais Hepáticas Isoladas	49
4.4. Resultados da Indução da Trans-diferenciação das Células Ovais Hepáticas em Resposta às Diferentes Condições de Cultivo	53
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	67
7. ANEXOS	69
8. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADJ	fatores adjuvantes
A ₂₆₀	absorbância de 260 nm
A ₂₈₀	absorbância de 280 nm
2AAF	2-acetil-amino-fluorene
BSA	soro-albumina bovina
C	ratos Wistar controles
CD11c	receptor para MHC classe II
CD34	receptor para MHC classe I
CD45	receptor para MHC classe I
cDNA	DNA complementar
CHC	carcinoma hepatocelular
CH	células hematopoiéticas
CN	controle negativo
COH	células ovas hepáticas
CP	controle positivo
CTRL 30d	controle 30 dias
CTRL 60d	controle 60 dias
DEPC	dietilpirocarbonato
DM	Diabetes melito
DM1	Diabetes melito tipo I
DM2	Diabetes melito tipo II

DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
ECs	células endoteliais
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
et al.	e outros
FACS	densitometria de fluxo celular
FC	fatores de crescimento
FC 30d	fatores de crescimento 30 dias
FC 60d	fatores de crescimento 60 dias
Flk-5	fator ligante V
FN	fibronectina
Glucagon	hormônio expresso e secretado pelas células alfa pancreáticas
Glut2	transportador de glicose tipo II
Glut4	transportador de glicose tipo IV
HGF	fator de crescimento hepatocítico
HSC	células estreladas hepáticas
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IL-3	interleucina 3
INF(s)	interferon(s)
KCs	células de Kupffer
Krt-19	citoqueratina 19
LAM	Laminina
MACS	separação celular magnética
MNC	células mononucleares

NIH	“National Institute of Health”
Nkx 6.1	Nk homeobox gene 6.1
Nkx 2.2	Nk homeobox gene 2.2
NeuroD1	Neurogenic differentiation 1
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pdx-1	Pancreatic duodenal homeobox-1
Pax-4	Paired domain homeobox gene-4
Pax-6	Paired domain homeobox gene-6
PM	marcador de peso molecular
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase pós transcriptase reversa
SFB	soro fetal bovino
Sst	somatostatina
TA	temperatura ambiente
Taq	DNA polimerase purificada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-ácido bórico-EDTA
Thy1.1	Thymus cell antigen, type 1.1
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

U	unidades
U.A.	unidades arbitrárias
U.A.D.O.	unidades arbitrárias de densidade óptica
UI	unidades internacionais
Vol	volume

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

α	alfa
β	beta
γ	gama
p	significância estatística
ρ	coeficiente de correlação linear de Spearman
°C	graus Celsius
μ	micro
g	grama
kDa	quiloDalton
kg	quilograma
L	litro
mL	mililitro
M	molar
mg	miligrama
mg/dia	miligrama por dia
ng	nanograma
nm	nanômetro
s	segundos
V	volts

2d	2 dias
4d	4 dias
7d	7 dias
9d	9 dias
AA	álcool isoamílico
CCl_4	tetracloreto de carbono
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
KCl	cloreto de potássio
MgCl_2	cloreto de magnésio
MgSO_4	sulfato de magnésio
TRIS-HCl	tris(hidroximetil) aminometano hidrocloreto
TRIS- SO_4	tris(hidroximetil) aminometano sulfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de uma ilhota pancreática e suas células endócrinas pancreáticas. (Adaptado de Trucco M). **Pág. 07**

Figura 2: O Transplante de Ilhotas Pancreáticas. **Pág. 10**

Figura 3: Representação gráfica ilustrativa da plasticidade de uma célula-tronco em relação à diferenciação celular. **Pág. 12**

Figura 4: Representação esquemática da plasticidade de uma célula-tronco adulta. **Pág. 14**

Figura 5: As Células Ovais Hepáticas **Pág. 18**

Figura 6: Origem e proliferação das células ovas hepáticas após tratamento com 2AAF. **Pág. 22**

Figura 7: Delineamento experimental. **Pág. 24**

Figura 8: Ativação das células ovas hepáticas a partir do tratamento crônico com 2-acetoaminofluorene (2AAF) seguido de dose única de álcool amílico (AA). **Pág. 27**

Figura 9: Separação das Células Ovais Hepáticas por Gradiente de Ficoll. **Pág. 30**

Figura 10: Isolamento das Células Ovais Hepáticas através de Esferas Magnéticas Dynalbeads® Thy1.1 **Pág. 32**

Figura 11: Visualização da integridade do RNA total extraído de todos os grupos experimentais após eletroforese em gel de agarose 2%. **Pág. 35**

Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNA de Actb amplificado por RT-PCR em diferentes temperaturas de *annealing*. **Pág. 40**

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNA de Actb amplificados por RT-PCR em diferentes ciclos de amplificação. **Pág. 42**

Figura 14: Análise anátomo-patológica de tecido hepático de ratos Wistar controles e tratados com 2AAF/AA. **Pág. 45**

Figura 15: Expressão de Thy1.1 e HGF em fígado de ratos Wistar tratados com 2-AAF por 2, 4, 7 e 9 dias. **Pág. 47**

Figura 16: Expressão de Thy1.1 e Krt19 em fígado de ratos Wistar tratados com 2-AAF por 2, 4, 7 e 9 dias. **Pág. 48**

Figura 17: Ilustração do processo de isolamento das células ovais hepáticas. **Pág. 50**

Figura 18: Gel representativo da análise por RT-PCR da expressão gênica de Thy1.1, , CD11c e CD45 em extratos de células obtidos antes e após o isolamento imunomagnético. **Pág. 52**

Figura 19: Gel representativo da análise por RT-PCR da expressão gênica de Thy1.1, HGF, Pdx-1, Pax-4, Pax-6, insulina 1, insulina 2, Glucagon, Somatostatina, Glut2 e Actb em extratos de células obtidos após cada fase e condição de cultivo específicos. **Pág. 57**

Figura 20: Fatores de transcrição até o momento descritos, relacionados com o desenvolvimento pancreático.

Pág. 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Expressão de Marcadores Genéticos em Células Hepáticas de Animais Fetos e Adultos. Pág **16**
- Tabela 2:** Lista dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR. Pág **38**

RESUMO

Leite AR. Indução “in vitro” da trans-diferenciação de células ovais hepáticas em estruturas semelhantes às ilhotas pancreáticas. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUÇÃO: Embora as células-tronco possuam grande capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares no organismo, tanto “in vivo” como “in vitro”, a produção de células endócrinas pancreáticas e de células produtoras de insulina, a partir destes tipos celulares em animais adultos, não está completamente demonstrada. A proliferação das células ovais hepáticas (COH) pode ser induzida pela administração de 2-AAF. Estudos mostram que COH são capazes de se trans-diferenciar “in vitro” em células endócrinas pancreáticas, quando cultivadas por longos períodos e em altas concentrações de glicose. O objetivo desta tese foi induzir a trans-diferenciação de COH de ratos em estruturas semelhantes às ilhotas pancreáticas, em períodos mais curtos de cultivo, utilizando fatores de crescimento específicos e componentes de matriz extracelular. **MÉTODOS:** A proliferação das COH foi induzida pelo tratamento com 2AAF/AA e as células foram isoladas e purificadas por gradiente de Ficoll seguido por MACS. As COH foram cultivadas nas por 30 e 60 dias na presença ou não de fatores de crescimento específicos e adjuvantes e sobre dois diferentes tipos substrato de matriz extracelular: fibronectina e laminina. A expressão de mRNA foi detectada por RT-PCR. **RESULTADOS:** A expressão de mRNA aumentada de Thy1.1 e Krt19 e diminuída de HGF confirmaram a eficiência do tratamento prolongado com 2AAF seguida por injeção de AA. A baixa expressão de mRNA de CD11c em todos os extratos celulares e uma expressão significativa de CD45 somente nas frações de células que não se ligaram às esferas magnéticas evidenciaram que obtivemos preparações enriquecidas de COH. A detecção da

expressão de mRNA de Pdx-1, Pax-6 e insulina 2, confirmam que em apenas 1 mês de cultivo na presença de substrato de fibronectina e fatores de crescimento específicos, já foi possível induzir a trans-diferenciação de COH em células endócrinas pancreáticas. A detecção da expressão de mRNA de Pdx-1, insulina 1 e 2, Glut2 e somatostatina confirmam que em apenas 1 mês de cultivo sobre substrato de laminina e na presença fatores de crescimento específicos, já foi possível induzir a trans-diferenciação de COH em células endócrinas pancreáticas. **CONCLUSÃO:** O processo de diferenciação celular de COH em células endócrinas pancreáticas envolve a combinação de funções exercidas pela matriz extracelular, assim como de fatores de crescimento que ora estimulam, ora inibem o processo de diferenciação. Ainda, por se tratarem de células-tronco não pancreáticas as COH parecem seguir caminhos semelhantes, porém não idênticos para atingir uma diferenciação celular completa de células semelhantes às ilhotas pancreáticas.

SUMMARY

Leite AR. "In vitro" induction of hepatic oval cell transdifferentiation into structures similar to pancreatic islets. [Theses]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006.

INTRODUCTION: Although stem cells have the ability to differentiate "in vivo" and "in vitro" into several types of cells in the body, the production of endocrine pancreatic cells and insulin producing cells from adult stem cells is not completely elucidated. Hepatic oval cell (HOC) proliferation can be induced by 2-AAF administration. Studies have showed that HOC can transdifferentiate "in vitro" into endocrine pancreatic cells, when cultured for long periods and with high glucose concentrations. The aim of this study was to induce rat HOC transdifferentiation in shorter periods of culturing, with specific growth factors and extracellular matrix components. **METHODS:** HOC proliferation was induced by 2-AAF/AA treatment. HOC were isolated by MACS following Ficoll gradient separation. HOC were cultured for 30 and 60 days with or without specific growth factors, additional factors and on two different matrix component substrates: fibronectin and laminin. The mRNA expression was evaluated by RT-PCR. **RESULTS:** The higher Thy1.1 and Krt19 and lower HGF mRNA expression confirm the efficiency of the 2-AAF/AA treatment. CD45 mRNA expression was lower the in positive cell isolation [median and range: 0.053 (0.038-0.098)] in comparison to the negative isolation [0.424 (0.225-0.571)]; $p < 0.05$. Although CD11c mRNA expression in cell extracts was lower before MACS [median and range: 0.091 (0.090-0.106)], after sorting there was a statistically significant difference between positive [0.053 (0.036-0.073)] and negative separations [0.118 (0.103-0.120)]; $p < 0.05$. The mRNA expression of Pdx-1, Pax-6 and insulin 2, confirm that HOC cultured for only 1 month on fibronectin and specific growth factors, already induce HOC transdifferentiation into endocrine

pancreatic cells. Also, Pdx-1, insulin 1 and 2, Glut2 and somatostatin expression confirm that HOC cultured for only 1 month on laminin and growth factors induce HOC transdifferentiation. **CONCLUSION:** The HOC differentiation process into endocrine pancreatic cells involve the combination of factors present on the extracellular matrix as well as on the growth factors that can stimulate or inhibit the differentiation process. Also, by the fact of being non- pancreatic stem cells, HOC seems to follow similar but not identical path to the complete pancreatic islet cells differentiation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes melito

Diabetes melito (DM) se refere a um grupo de doenças crônicas metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina ou, também, na ação deste hormônio.¹ Este déficit hormonal que caracteriza o DM altera o metabolismo dos carboidratos, proteínas e gorduras e, se não tratado adequadamente, gera complicações que pode levar em longo prazo, a invalidez ou a morte. O DM é caracterizado em dois tipos: o tipo 1, também conhecido como Diabetes juvenil, Diabetes auto-imune ou Diabetes melito insulino-dependente (IDDM) e o tipo 2, anteriormente denominado não insulino-dependente (NIDDM).

O Diabetes tipo 2 é responsável por cerca de 90% dos indivíduos diabéticos e caracteriza-se por hiperglicemia associada a vários graus de resistência à insulina e disfunções nas células responsáveis pela síntese e secreção deste hormônio, as células beta. Ao contrário do que ocorre no Diabetes melito tipo 1 (DM1), o Diabetes melito tipo 2 (DM2) possui uma base genética mais evidente,

que, associada a fatores ambientais, é responsável por sua maior prevalência. O censo de Diabetes realizado na população brasileira, entre 1986 e 1988, estimou em 5 milhões o número de indivíduos com DM, mostrando que a prevalência na população urbana de 30 a 69 anos era de 7,6%, independentemente, do sexo e do nível sócio-econômico, variando de 5,22% em Brasília a 9,66% em São Paulo. Este estudo demonstrou, também, que mais da metade dos portadores de DM (53,5%) desconhecia seu diagnóstico e que dentre os que tinham conhecimento de seu diagnóstico, 23% não faziam qualquer tipo de tratamento. ² A partir deste dado, a taxa de prevalência do Diabetes na população em geral pode ser estimada em cerca de 33,8 diabéticos por 1.000 habitantes. Estima-se que o número de indivíduos diabéticos dobrará em todo o mundo chegando a 240 milhões de indivíduos afetados em 2010. Dentre as regiões mais vulneráveis encontra-se o Brasil, onde o aumento da expectativa de vida da população, o sedentarismo e o aumento da ingesta calórica exercem papel importante no aparecimento de pessoas com Diabetes. Mais recentemente, um estudo realizado na região urbana de Ribeirão Preto (SP) revelou que a prevalência de Diabetes subiu de 9,5% em 1988 para 12,3% em 2000. ³ O forte componente genético do DM2 é evidenciado pela concordância de 90% em gêmeos monovitelíneos. Pelo censo de 1988 na população brasileira o antecedente familiar de Diabetes foi referido em 12,5% da população em comparação a 5,8% sem antecedentes familiares, ou seja, um risco 2,2x maior de um indivíduo com familiares com Diabetes desenvolver a doença. Outros estudos mostram que o risco é de 5-10x maior de desenvolver a doença em um indivíduo com história familiar em relação à população em geral.

O DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adolescentes em países da Europa e Estados Unidos e ocorre, principalmente, durante os primeiros 20 anos de vida do indivíduo. Os sintomas clínicos da doença geralmente não são detectados até que aproximadamente 90% das células produtoras de insulina tenha sido completamente destruída pelo seu sistema imunológico.⁴

O DM1 é considerado uma doença auto-imune devido às seguintes características:

- 1) infiltração linfocítica das ilhotas (insulite) à época do diagnóstico,
- 2) detecção de auto-anticorpos específicos (anti-ilhotas, anti-insulina, anti-GAD e anti-fosfotirosina),
- 3) presença freqüente de outras doenças auto-imunes (por exemplo, tireoidite de Hashimoto) ou anticorpos contra essas glândulas em pacientes ou em seus familiares,
- 4) semelhança entre a doença humana e modelos animais espontâneos de Diabetes auto-imune (rato BB, camundongo NOD, etc.),
- 5) suscetibilidade genética ligada ao sistema HLA, (a taxa de concordância para DM1 é de cerca de 15% em irmãos com HLA idêntico).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association), com a Fundação Internacional de Diabetes Juvenil (Juvenile Diabetes Foundation International) e com o Centro Americano de Controle do Diabetes (US Centers for Diabetes Control), a prevalência do Diabetes hoje é estimada em mais de 143 milhões. Em 1985 a estimativa era de 30 milhões de

peessoas com Diabetes em todo o mundo. Hoje, a prevalência global é de quase 5 vezes mais alta. A natureza epidemiológica do Diabetes continua a afetar um número cada vez maior de pessoas em todo o mundo, enquanto o aconselhamento e prevenção da população continua baixo. Muitas pessoas que têm Diabetes não conhecem os sintomas da doença e não sabem como tratá-la.

A incidência (novos casos por ano) do Diabetes continua crescendo como resultado de inúmeros e variados fatores que se encontram inter-relacionados; tais como: fator genético, idade, maus hábitos alimentares, obesidade, sedentarismo, entre outros.^{5, 6}

A hiperglicemia representa o maior vilão do paciente diabético, especialmente em longo prazo. Quando inadequadamente controlada, a hiperglicemia crônica pode gerar tanto complicações microvasculares, (por exemplo; retinopatia e cegueira, nefropatias e falência renal, neuropatias, úlceras nos pés e até mesmo, amputação do membro) como complicações macrovasculares, (por exemplo; aterosclerose cardiovascular, doenças vasculares periféricas e acidentes vasculares cerebrais). Infelizmente, o tratamento adequado do DM1 depende, ainda, de múltiplas injeções diárias de insulina. No entanto, este tratamento além de invasivo e bastante desconfortável, aumenta a incidência de eventos hipoglicêmicos no paciente e não previne totalmente o risco de desenvolvimento de complicações microvasculares. A prevenção das complicações secundárias do DM baseia-se na instituição de tratamento intensivo e, também, no encorajamento de hábitos disciplinares voltados à manutenção de mudanças no estilo de vida com resultados, muitas vezes, frustrantes em crianças.

Sendo assim, fazem-se necessários grandes esforços em estudos visando a prevenção e a possível cura do Diabetes melito. ⁷

1.2. As Ilhotas Pancreáticas

As ilhotas de Langerhans constituem a unidade morfológica e funcional da porção endócrina do pâncreas. As ilhotas pancreáticas, como ilustrado na Figura 1 são estruturas esféricas, imersas na porção exócrina do pâncreas e formadas por cordões celulares, entremeados por capilares, cujas células são interconectadas por junções intercelulares, incluindo as junções comunicantes. ^{8, 9, 10}. Estes cordões são constituídos por quatro tipos celulares: células β ou B, responsáveis pela síntese e secreção de insulina; células α ou A, responsáveis pela síntese e secreção de glucagon; células δ ou D, secretoras de somatostatina e células PP, responsáveis pela secreção de polipeptídio pancreático. As células, no interior das ilhotas, estão organizadas de forma não aleatória. As células α localizam-se preferencialmente na periferia das ilhotas; as células δ e PP podem ser encontradas tanto na periferia como no interior das ilhotas, já as células β localizam-se na região central das ilhotas, formando agregados celulares.

Células β adultas são altamente diferenciadas, apresentando capacidade limitada de proliferação e perda de produção de insulina quando mantidas em cultura. A identificação de precursores das células β e o conhecimento dos sinais que determinam a diferenciação destas células para o fenótipo maduro poderiam permitir a expansão de células β “in vitro”. A utilização de células-tronco

embrionárias a partir de fetos humanos abortados ou de embriões descartados após procedimento de fertilização “in vitro” está agora se iniciando e o uso de células-tronco originadas de tecido adulto pode ser uma fonte igualmente importante para terapia de reposição celular.¹¹

Trucco M. *J Clin Invest Review*

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da ilhota de Langerhans e suas células endócrinas pancreáticas (adaptado de Trucco et al. JCI 33:231-238).

3. O Transplante de Ilhotas Pancreáticas

Apesar do transplante de ilhotas de Langerhans ser um procedimento menos invasivo que o transplante de pâncreas, é ainda considerado um procedimento experimental, que somente deve ser realizado no contexto de ensaios clínicos. Caso os estudos clínicos em andamento consigam confirmar os bons resultados do transplante de ilhotas obtidos a partir do ano 2000 pelo grupo de Edmonton, como ilustrado na Figura 2,¹² a limitação na obtenção de ilhotas associada à escassez de órgãos disponíveis para transplante pode vir a ser um importante obstáculo à realização rotineira de transplantes de ilhotas em diabéticos tipo 1 de difícil controle. Novas estratégias devem ser, portanto, utilizadas para a obtenção de células produtoras de insulina.

Os últimos 20 anos tem havido grande avanço no estudo de transplante de pâncreas para possível cura para o Diabetes. O índice de indivíduos sobreviventes após 1 ano de transplante é de 82% quando o pâncreas é transplantado após um transplante renal, 74%; quando o órgão é transplantado juntamente com o rim e de 76% no transplante isolado de pâncreas.^{13, 14} A maioria destes sobreviventes mantém suas células betas funcionando por, aproximadamente, 10 anos. Estes benefícios não ocorrem, entretanto, sem causar riscos ao paciente. Além de demorada e laboriosa, a cirurgia está ainda, associada a um alto grau de mortalidade.¹⁵ A necessidade de tratamento crônico com imunossupressores, inevitável para evitar rejeição, leva as mesmas infecções e riscos como qualquer

outro transplante de órgão. Logo, a decisão por um transplante de pâncreas é geralmente evitada até que um quadro de insuficiência renal esteja estabelecido no paciente. E, já nesta fase, mesmo após o transplante, o paciente não fica livre do risco de complicações secundárias do Diabetes.

O transplante de ilhotas pancreáticas tem sido proposto como uma alternativa mais segura quando comparado ao transplante de pâncreas,^{16, 17, 18, 19} já que:

- 1) as ilhotas podem ser isoladas e implantadas pela cateterização percutânea da veia porta, sob anestesia local, livrando o paciente do risco de uma anestesia geral;
- 2) as ilhotas podem ser manipuladas geneticamente “in vitro” para resistirem aos ataques imunológicos, ou pela redução de imunógenos, ou pela expressão de imunomoduladores e
- 3) as ilhotas podem ser encapsuladas para que a insulina possa ser liberada, evitando um possível ataque do sistema imunológico deste indivíduo.^{20, 21}

Figura 2: Segundo o protocolo de Edmonton, o pâncreas do doador cadáver é retirado (1), a porção exócrina do pâncreas é digerida por enzimas específicas, a porção endócrina que contém as ilhotas de Langerhans é cuidadosamente selecionada (2). As ilhotas pancreáticas são isoladas, sua viabilidade é testada e, posteriormente, estas são injetadas via veia porta do receptor diabético (3) as ilhotas se alojam na região portal do fígado e secretam insulina (4).

Também se verifica, entretanto, problemas com o transplante de ilhotas, estes incluem a dificuldade de obtenção de um número suficiente de ilhotas viáveis para o transplante, a necessidade de agentes imunossupressores para

prevenir possíveis rejeições, assim como num transplante de pâncreas. Além disso, é sabido que o uso de imunossupressores pode levar a uma diminuição na secreção de insulina, aumento na resistência ao hormônio e reações inflamatórias danosas ao tecido.^{17, 18}

1.4. As Células-Tronco ou “Stem Cells”

Desde seu recente advento, a aplicação das células-tronco (“stem cells”) indiferenciadas e embrionárias tem sido muito explorada e estudada. É uma célula proveniente do embrião, do feto ou do organismo adulto que possui, sob determinadas condições, a capacidade de se reproduzir por longos períodos, ou no caso da célula-tronco adulta, por toda a vida do organismo. Uma das propriedades deste tipo celular é a capacidade de dar origem às células especializadas, reconstruir tecidos ou órgãos do corpo, ou de proliferar indefinidamente.

1.4.1. Classificação das Células-Tronco

Segundo Wagers e Weissman²² as células-tronco podem ser classificadas de acordo com o seu potencial de desenvolvimento em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. Como ilustrado na Figura 3, células totipotentes são aquelas capazes de dar origem a todos os tipos de células embrionárias e extra-embrionárias. As pluripotentes têm a capacidade de originar tipos celulares que se desenvolvem a partir dos três folhetos embrionários

(mesoderma, endoderma e ectoderma), dos quais têm origem todos os tipos celulares do organismo. As multipotentes têm a capacidade de dar origem a linhagens celulares pré-estabelecidas, as oligopotentes originam linhagens celulares restritas e, finalmente, as unipotentes são capazes de dar origem, somente, a uma determinada célula madura.²³

Figura 3: Representação gráfica ilustrativa da plasticidade de uma célula-tronco em relação à diferenciação celular.

Plasticidade é a capacidade de uma célula-tronco adulta proveniente de um tecido qualquer de gerar células especializadas de tecidos diferentes, como representado na Figura 4. De acordo com sua plasticidade, as células tronco podem gerar mecanismos como a diferenciação e trans-diferenciação celulares, sob determinadas condições. A diferenciação celular é um processo pelo qual uma célula não especializada, tal como uma célula tronco, se torna especializada em um determinado tipo celular no mesmo tecido que constitui o organismo. A trans-diferenciação ocorre quando uma célula-tronco de um determinado tecido dá origem a um determinado tipo celular de outro tecido.

Durante a diferenciação e a trans-diferenciação, certos genes são ativados e outros desativados em um fenômeno de regulação gênica. Como resultado, uma célula diferenciada desenvolve estruturas específicas e realiza determinadas funções do organismo.

Figura 4: Representação esquemática da plasticidade de uma célula-tronco adulta.

Devido a sua pluripotência e plasticidade, o estudo de diversos tipos celulares de células-tronco tem sido de grande valia tanto na renovação de tecidos “in vitro”, que possam ter sido lesados pela idade ou trauma; como na reconstrução de órgãos para tratar inúmeras doenças dentre as quais o Diabetes.

24, 25, 26

Células-tronco pluripotentes derivadas de diversos tecidos como fígado, sangue, entre outros, têm sido isoladas tanto de fetos como de animais adultos, demonstrando ter a capacidade de se propagar e diferenciar em diversos tipos celulares “in vitro”.^{27, 28} Muito embora estas células possuam esta grande capacidade de diferenciação, a produção de células endócrinas pancreáticas e de células beta produtoras de insulina, a partir destes tipos celulares em animais adultos, ainda não está completamente elucidado e demonstrado.

A trans-diferenciação de células ductais e acinares também tem sido sugerida como fonte de células β ^{29, 30}, mas até o momento, nenhum procedimento experimental foi capaz de gerar células β maduras em quantidades suficientes para utilização em terapia celular no DM. Desta forma, a procura por fontes alternativas de células produtoras de insulina continua. Edlund ressalta em uma revisão sobre organogênese pancreática publicada em 2002 que, independentemente da célula-tronco que seja utilizada na geração de células β diferenciadas, é necessário que se garanta a funcionalidade da célula obtida. O verdadeiro indicador da função destas células existe e é o gene homeobox Pdx-1, que é altamente expresso nas células β adultas e cruciais para o seu funcionamento.³¹

Vários estudos já demonstraram que o Pdx-1 é capaz de conferir características de células β à células não- β . Uma linhagem de células intestinais de rato (IEC-6) transfectada com um plasmídeo de expressão de Pdx-1 passou a expressar genes específicos de célula β , inclusive a insulina, tanto “in vitro” após estímulo com beta-celulina quanto “in vivo” após transplante sob a cápsula renal.³² A expressão exógena de Pdx-1 em duas linhagens de células produtoras de glucagon induziu a expressão de genes específicos de células β , inclusive o gene da insulina.^{33, 34}

1.5. Célula Oval Hepática

Células ovais hepáticas (COH) são consideradas células-tronco facultativas, que surgem quando a proliferação celular de hepatócitos está inibida em situações de lesão hepática grave. Estas células, como representadas na Figura 5, são de pequeno tamanho, medindo aproximadamente 10 μm , possuem um núcleo grande em relação ao citoplasma, de formato oval, e localizam-se ao longo dos canais de Hering.

Alguns marcadores clássicos das COH estão listados na Tabela I. As COH expressam altos níveis de α -fetoproteína, algumas citoqueratinas e marcadores de células-tronco hematopoiéticas (Thy1.1, CD-34, c-kit, Sca-1).^{35, 36} Estudos evidenciam que, após indução de sua proliferação pela lesão hepática grave, COH são capazes de se trans-diferenciar em vários tipos celulares, tais como hepatócitos³⁷, células do epitélio biliar³⁸, células intestinais³⁹ e células endócrinas pancreáticas⁴⁰, apresentando potencial para utilização em terapia celular.⁴¹

Tabela I: Expressão de Marcadores Genéticos em Células Hepáticas de Animais Fetos e Adultos. ⁽⁴²⁾

Marcadores	Hepatoblasto	Hepatócito	Célula Ductal	Célula Oval
Citoqueratinas				
Ck7 e Ck19	-	-	+	+
Ck8 e Ck18	+	+	+	+
Superfície Celular				
Thy1.1	?	-	-	+
CD34	?	-	+	+
CD45	?	-	-	+
c-kit	?	-	+	+
Conexina 26,32	?	+	-	-
Conexina 43	?	-	+	+
IB4	-	-	+	+
Proteínas do Soro				
AFP	+	+	-	+
Albumina	+	+	-	+
Apo AIV	?	+	-	?
Apo B	?	+	-	?
Enzimas				
GGT IV	+	-	+	+
ADH	-	+	-	?
Aldolase B	-	+	-	?

1.5.1. Origem das Células Ovais Hepáticas

Inúmeros pesquisadores têm tentado identificar e caracterizar as COH, muito embora resultados convincentes ainda não foram totalmente descritos. Inúmeros avanços nesta linha de pesquisa têm contribuído para a identificação das células-tronco hepáticas. Por exemplo: a identificação de marcadores de superfície de células-tronco hematopoiéticas, o desenvolvimento de técnicas de citometria de fluxo (*cell sorting*) e os avanços na pesquisa clínica com o transplante de medula óssea.

Petersen e colaboradores ⁴³ provaram primeiramente que células de medula óssea de ratos, quando transplantadas migravam até o fígado e se diferenciavam em COH e em hepatócitos. Pouco tempo depois, resultados semelhantes também foram encontrados em camundongos ⁴⁴ e em pacientes humanos. ⁴⁵ Muito recentemente, Lagasse e colaboradores ⁴⁶ demonstraram que células-tronco hematopoiéticas purificadas poderiam se diferenciar em hepatócitos e reconstituir parte do tecido hepático lesado em camundongos com novos hepatócitos recentemente gerados de células-tronco.

A existência de um precursor para uma população de COH pré-existente no fígado foi inicialmente sugerida após o tratamento de camundongos com a combinação de 2-acetoaminofluorene (2AAF) e álcool amílico (AA) que se acredita induzir a proliferação de uma população de células localizadas na região periportal do órgão. ⁴⁷ Estas células apresentavam marcadores clássicos de COH.

A proliferação de COH induzida por 2AAF é preferencialmente gerada pela proliferação de ductos biliares terminais que constituem o nicho primário e

mesênquima das células-tronco hepáticas. As COH formam estruturas ductulares, representando uma extensão dos canais de Hering. Esta organização histológica promove uma drenagem biliar contínua de hepatócitos e um fluxo ininterrupto de sangue. Os ductos constituídos de células ovais apresentam-se rodeados por uma membrana basal contínua, e as COH estão ligadas, via junções intercelulares com células estreladas.⁴⁸

A lesão hepatocelular gerada pelo tratamento com 2AAF, como ilustrado na Figura 6, inicia uma resposta imunológica no fígado, a qual leva à secreção de uma complexa mistura de citocinas.⁴⁹ Tais sinais promovem a infiltração e ou a expansão das células de Kupffer (KC) e de células estreladas (SC) (Figura 6). Quando a proliferação e regeneração dos hepatócitos são inibidas, as COH são induzidas a proliferar respondendo aos estímulos químicos das citocinas liberadas com o processo inflamatório. O fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-6 (IL-6) são secretados pelas KC e estimulam a proliferação das COH, enquanto isso outros fatores como interferon- γ (IFN- γ), leukemia inhibitory factor (LIF) e oncostamina M (OSM) também são liberados no fígado e potencializam a proliferação de COH.

Figura 6: Origem e proliferação das células ovas hepáticas após tratamento com 2AAF.

Estudos histológicos sobre o desenvolvimento hepático demonstram que a maioria dos hepatócitos e das células de ductos biliares em fígados de animais adultos originalmente são derivados de hepatoblastos residentes no fígado fetal.

Desta forma, hepatoblastos podem ser considerados como célula-tronco bipotente/progenitora de células epiteliais no fígado. Não é possível encontrar, no entanto, células morfologicamente e fenotipicamente semelhantes aos hepatoblastos em um fígado normal adulto, mesmo quando em fase de regeneração hepática.

As COH são encontradas no fígado quando a proliferação celular de hepatócitos está inibida ou é seguida de algum tipo de dano hepático.²³ⁱ A proliferação destas células pode ser induzida artificialmente por meio da administração de 2-AAF antes ou durante uma lesão hepática.

Demonstrou-se que as COH indiferenciadas, isoladas e purificadas, são capazes de se trans-diferenciar em células endócrinas pancreáticas, quando cultivadas com altas concentrações de glicose .

2. OBJETIVOS

Esta investigação tem como objetivo induzir a trans-diferenciação “in vitro” de células ovais hepáticas em estruturas semelhantes às ilhotas pancreáticas.

Para atingir tal objetivo foram desenvolvidas técnicas para:

- 1) Induzir a proliferação de COH pelo tratamento prolongado com 2AAF/AA.
- 2) Padronizar método alternativo de isolamento e purificação de COH.
- 3) Caracterizar as COH isoladas.
- 4) Induzir a trans-diferenciação de COH pelo cultivo utilizando:
 - ✓ Fatores de crescimento específicos
 - ✓ Altas concentrações de glicose e nicotinamida
 - ✓ Substrato celular de fibronectina e laminina

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

As Células Ovais Hepáticas isoladas e caracterizadas foram semeadas na concentração de 4×10^7 células por frasco de 75 cm^2 e cultivadas nas seguintes condições descritas a seguir como mostra a Figura 7 :

a) **Grupo CTRL 30**: cultivado por 30 dias em meio de Dubelcco modificado por Iscove (IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium. Invitrogen Corporation. Carlsbad, EUA), livre de soro fetal bovino (SFB. Cultlab. Campinas, SP), glicose ou fatores de crescimento específicos.

b) **Grupo CTRL 60**: cultivado por 60 dias em meio IMDM, livre de SFB, glicose ou fatores de crescimento específicos.

c) **Grupo FC 30**: cultivado por 30 dias em meio IMDM, livre de SFB e glicose, suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5.

d) **Grupo FC 60**: cultivado por 60 dias em meio IMDM, livre de SFB e glicose, suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5.

e) **Grupo FC+ADJ 30**: cultivado primeiramente por 30 dias em meio IMDM, livre de SFB e glicose, suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5. E cultivado

mais 30 dias em meio RPMI 1640 suplementado os adjuvantes: 10 mM de nicotinamida, 23 mM de glicose e 10% de SFB.

f) **Grupo FN 30**: cultivado por 30 dias em meio IMDM, sobre 12 µg/mL de substrato celular de fibronectina, livre de SFB, glicose ou fatores de crescimento específicos.

g) **Grupo FC+FN 30**: cultivado por 30 dias em meio IMDM, sobre 12 µg/mL de substrato celular de fibronectina (Sigma), livre de SFB, glicose e suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5.

h) **Grupo FC+FN+ADJ 30**: cultivado primeiramente por 30 dias em meio IMDM, sobre 12 µg/mL de substrato celular de fibronectina (Sigma), livre de SFB, glicose e suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5. E cultivado mais 30 dias em meio RPMI 1640 suplementado com os adjuvantes: 10 mM de nicotinamida, 23 mM de glicose e 10% de SFB.

i) **Grupo LAM 30**: cultivado por 30 dias em meio IMDM, sobre 12 µg/mL de substrato celular de laminina (Sigma), livre de SFB, glicose ou fatores de crescimento específicos.

j) **Grupo FC+LAM 30**: cultivado por 30 dias em meio IMDM, sobre 12 µg/mL de substrato celular de laminina (Sigma), livre de SFB, glicose e suplementado com os fatores de crescimento específicos: 10 ng/mL de “stem cell factor”, 10 ng/mL de IL-3, 10 ng/mL de Flk-5.

Após cada período de cultivo, o RNA total das células foi extraído e o conteúdo de RNAm foi verificado por RT-PCR.

Figura 7: Delineamento experimental.

3.2. Fluxograma dos Experimentos

3.3. Indução da Proliferação das Células Ovais Hepáticas

Cristais solubilizados de 25 mg de 2-acetoaminofluorene (2-AAF) (Sigma, San Diego, EUA) foram injetados intraperitonealmente, durante 9 dias em ratos Wistar adultos com, aproximadamente, 250 g de peso. Após 9 dias de tratamento com 2-AAF, uma única dose de 1 mL/kg de álcool amílico (AA) (Sigma) foi injetada intraperitonealmente em cada animal, 2 h antes do seu sacrifício, para que fosse promovida a ativação e proliferação das COH, como descrito por Leite et al.2004 (Figura 7) ⁵⁰.

Figura 8: Ativação das células ovais hepáticas a partir do tratamento crônico com 2-acetoaminofluorene (2AAF) seguido de dose única de álcool amílico (AA).

3.4. Análise Anátomo-patológica

Fragmentos de aproximadamente 0.5 cm do fígado dos animais controles e tratados foram retirado para análise histológica.

Os fragmentos foram primeiramente fixados por 8 h em uma solução denominada metacar, a qual era constituída de 60% (vol:vol) de metanol (Sigma), 30% (vol:vol) de clorofórmio (Chenco) e 10% (vol:vol) de ácido acético glacial (Chenco). Após o período de pré-fixação, os fragmentos foram fixados e armazenados em álcool 95% .

3.5. Isolamento das Células Ovais Hepáticas

O fígado dos animais tratados por 9 dias com 2AAF foi retirado e dividido em 4 lóbulos iguais e imediatamente imersos em PBS estéril gelado, no interior do fluxo laminar. O tecido foi primeiramente lavado nesta solução até que todo o material sanguíneo fosse retirado e posteriormente fragmentado com uma tesoura. Os fragmentos foram, então transferidos para o interior de beckers estéreis e lavados novamente com PBS gelado.

Após lavagem dos fragmentos, esses foram transferidos para o interior de tubos Falcon (Cultilab) com 5 mL de PBS e digeridos a 37° C por 25 min, em banho-maria, com agitação periódica, utilizando a collagenase tipo IV (Gibco BRL) em uma concentração de 15 mg para cada 5 mL de PBS. A digestão foi interrompida pela adição à solução, de 5% de soro fetal (Nutricel) bovino puro e gelado.

3.5.1. Separação das Células por Centrifugação

Após a digestão, uma primeira centrifugação foi realizada a 50 x g por 5 min a 4° C. O precipitado contendo os hepatócitos foi descartado e a fração do sobrenadante foi centrifugada novamente a 350 x g, por 10 min, a 4° C. O novo *pellet* obtido foi, então, ressuspendido em 2 mL de meio IMDM (Gibco BRL) para posterior separação celular por gradiente de Ficoll (Sigma). A pureza das células obtidas pós centrifugação foi analisada por RT-PCR.

3.5.2. Separação das Células Ovais Hepáticas por Gradiente de Ficoll

A separação por gradiente de Ficoll foi realizada em tubo Falcon de 50 mL, como demonstrado na ilustração abaixo: 5 mL solução de PBS estéril, 2 mL de homogeneizado de células, 5 mL de solução de Ficoll 1.12 g/mL e finalmente 5 mL de solução de Ficoll 1.2 g/mL **(a)**.

Figura 9: Separação das Células Ovais Hepáticas por Gradiente de Ficoll

Após centrifugação a 350 g por 20 min a 4° C, a interface compreendida entre 1.12 e 1.20 g/mL de Ficoll foi separada e re-centrifugada a 350 g por 5 min a 4° C **(b)**. A pureza das células obtidas pós isolamento com gradiente de Ficoll foi analisada por RT-PCR.

3.5.3. Isolamento das Células Ovais Hepáticas através de Esferas Magnéticas

Dynalbeads© Thy1.1

3.5.3.1. Preparação das Esferas Magnéticas para Utilização

As esferas magnéticas Dynalbeads© Thy1.1 foram primeiramente ressuspensas gentilmente no seu tubo de origem e um volume de aproximadamente 200 µL destas esferas foi transferido para um tubo *ependorf* de

1 mL contendo uma solução de lavagem (PBS suplementado com 0.1% de albumina (Sigma)). Este tubo com a solução de lavagem foi então acoplado a um concentrador de partículas magnéticas (MPC-Dynal) por aproximadamente 2 min. A lavagem foi feita retirando a solução utilizando-se uma pipeta *Pasteur* enquanto as esferas se mantinham acopladas magneticamente ao concentrador de partículas magnéticas (MPC). O tubo contendo as esferas foi retirado do MPC e as Dynalbeads® Thy1.1 ressuspensas em solução de lavagem novamente. Este procedimento foi repetido 3 vezes.

3.5.3.2. Incubação das Esferas Magnéticas Dynalbeads® Thy1.1 às Células Ovais Hepáticas

Uma população de 1×10^7 células foi resuspensa em meio IMDM e incubadas por 20 min em banho de gelo, sob agitação constante com 25 μ L de esferas magnéticas em uma proporção 1:1 (célula:esfera) **(c)**. Após incubação, os tubos contendo as células foram acoplados ao MPC por aproximadamente 3 min, para que as células ligadas positivamente às esferas Dynalbeads® Thy1.1 fossem isoladas e os demais tipos celulares descartados. Este procedimento foi realizado adicionando-se 1 mL de PBS/ 0.1% BSA aos tubos a cada retirada de células ligadas às esferas magnéticas, a fim de remover todas as células Thy1.1 positivas.

O desacoplamento das células Thy1.1 positivas acopladas às esferas foi realizado a 37° C *overnight* em MIDM em incubadora.

A pureza das células Thy1.1 positivas foi analisada por RT-PCR.

c)

Figura 10: Isolamento das Células Ovais Hepáticas através de Esferas Magnéticas Dynalbeads® Thy1.1

3.6. Caracterização das Células Ovais Hepáticas isoladas e purificadas:

Com a função de caracterizar os componentes celulares presentes em cada passo do processo de isolamento, o RNA total dos extratos celulares foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante, o qual será detalhadamente descrito adiante.

Cinco microgramas de RNA total foi utilizado para síntese de cDNA e subsequentemente amplificação por PCR. Os oligonucleotídeos foram desenhados baseados nas seguintes sequências: NM_012673: Thy1 (621 pb); NM_199498: Krt1-19 (185 pb); NM_031140: Vim (206 pb); M_25823: CD45 (265 pb); NM_031691: CD11c (143 pb); NM_007393: Actb (504 pb). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em um gel de agarose a 2%. Os sinais relativos às bandas foram analisados por densitometria a laser (Amersham Biosciences UK Limited. Buckinghamshire, England). Os dados de expressão

gênica foram representados pela mediana e range semi-interquartil de unidades arbitrárias de densitometria óptica em relação ao controle interno da reação. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas Segundo o teste não paramétrico de Kruskal-Walis suplementado pelo teste de Sheffé. A significância estatística foi fixada para $p < 0.05$.

3.7. Extração de RNA total

Um volume de 1 mL do reagente Trizol (Gibco BRL) foi adicionado a cada amostra de homogeneizado de células e estas foram homogeneizadas em vortex, nesta solução, por, aproximadamente, 10 s. Em seguida, o homogeneizado foi incubado por 5 min, à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos presentes na solução. Após incubação, foi adicionado, a cada amostra 200 μ L de clorofórmio (Chenco). Após adição, os tubos eppendorfs foram devidamente tampados e as amostras vigorosamente homogenizadas durante 15 s. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 a 3 min à temperatura ambiente.

As amostras foram, então, centrifugadas a 11.000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C, por 15 min. Após centrifugação, o volume, correspondente à fase aquosa presente nos tubos, foi cuidadosamente transferido para novos tubos eppendorfs estéreis.

O RNA presente nesta fase aquosa foi, então, devidamente precipitado com a adição de 500 μ L de álcool isopropílico (Sigma) e homogeneizado, vagorosamente, por 10 s. As amostras foram incubadas por 10 min à temperatura

ambiente e, após incubação, as amostras foram centrifugadas novamente a 11.000 g em centrífuga refrigerada a 4° C por 10 min.

Após centrifugação, todo o sobrenadante foi, então, removido e o *pellet* lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% gelado (Sigma). Procedeu-se nova centrifugação a 7.500 g por 5 min a 4 °C em centrífuga refrigerada e o *pellet* foi novamente lavado com 1 mL de etanol 75% gelado (Sigma). Para que fosse promovida uma completa lavagem, as amostras foram agitadas em vortex até que o “pellet” desprendesse totalmente do tubo eppendorf. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4 °C a 7.500 g em centrífuga refrigerada, o sobrenadante foi desprezado e o RNA precipitado, contido no *pellet*, foi mantido em estufa a 37° C por aproximadamente 10 min, para que se procedesse a total evaporação do álcool presente no tubo. O RNA presente em cada amostra foi ressuspendido em 100 µL de água ultrapura estéril tratada com dietipirocarbonato (DEPC) 0,01%. ²²

3.7.1. Visualização do RNA Total Extraído

Para analisar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,8% (Sigma) diluído em tampão TAE 1X (20 mM TRIS; 0,5 mM de acetato de sódio e 1,0 mM EDTA) (Sigma) (Figura 11).

Figura 11: Visualização da integridade do RNA total extraído de todos os grupos experimentais após eletroforese em gel de agarose 2%.

Legenda: **C** (fígado de rato controle); **2d** (fígado de rato tratado com 2-AAF por 2 dias); **4d** (fígado de rato tratado por 4 dias); **7d** (fígado de rato tratado por 7 dias); **9d** (fígado de rato tratado por 9 dias); **Ficoll** (Células obtidas após a separação por gradiente de Ficoll); **Beads +** (Células isoladas positivamente com esferas magnéticas Thy1.1); **Beads -** (Células não acopladas às esferas magnéticas).

Amostras contendo 5 μ g de RNA, previamente quantificadas por espectrofotometria (Genequant) pela razão da leitura de absorbância 260/280 nm, foram analisadas neste gel, para certificação da integridade do material a ser utilizado, pela visualização das bandas correspondentes às subunidades 28 S e 18 S do RNA total extraído. Para isso, as amostras foram homogeneizadas em 2

μL de tampão de corrida (50% glicerol, 2.5 mM EDTA e 0.25% de azul de bromofenol). Após homogeneização, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,2%. A corrida eletroforética procedeu-se a 80 V por 1 h e como tampão de corrida foi utilizado o tampão TAE 1X.

Após a corrida, o gel contendo o RNA foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

3.7.2. Quantificação do RNA Extraído

A concentração dos RNAs extraídos foi determinada no espectrofotômetro, *Hitachi U 2000* (Hitachi) pela absorbância em luz ultravioleta (UV) a 260 nm. O grau de pureza foi avaliado pela relação de densidade óptica (DO) 260/280 nm, sendo que, para o ensaio foram consideradas amostras com relação igual ou superior a 1,70.

Para verificar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18 e 28S, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (EtBr) 3,0 μg/mL e visualização em transiluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm. As amostras de RNA foram conservadas a -80° C, até posterior utilização.

3.8. Reação da Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Amostras de 2 μg de cada RNA total foram utilizadas para a síntese de cDNA por transcrição reversa. Em um volume final de reação de 20 μL, com a

utilização de oligonucleotídeos, foi adicionado, a cada amostra, tampão de enzima, DTT (100 mM) e a enzima *SuperScript II* (200 U). Esta solução foi incubada por 50 min a 42° C para a reação. A partir dos cDNAs obtidos, foram realizadas as curvas de ciclagem e de temperatura para padronização de cada primer específico, descritos na Tabela II .

Tabela II: Lista dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR.

Número de acesso	GENES DE INTERESSE	Homólogo humano	Sequência 5'-->3'	Sequência 3'-->5'	pb
NM_017017	Hgf	HGF	CTTCCTGTCACCATCCCCCTA	AAAGGCCTTGCAAGTGAATG	198
NM_012673	Thy1	THY1.1	AGACCCAGGACGGAGCTATT	CCCGCGTTTTGAGATATTTG	621
NM_138507	Ptprc	CD45	CTGCCTCAAACCTGACCCCTT	CGTGAGTGTGGTGAGGTCAG	265
NM_199498	Krt1-19	KRT1-19	GAGCTGGAGGTGAAGATTCG	TTGGTCCGGAAGTCATCTG	185
NM_031691	Itgax	CD11c	GGTGGAGTTGTGATCCTCCT	CACCAAACCTGCACCACAGTC	143
NM_031140	Vcl	VCL	CACGATCGAGAGCATCCTG	CTGGCGGCATATCTCTCTTC	206
NM_019129	Ins1	INS1	GTACCTGGTGTGTGGGAAC	CCAGTTGGTAGAGGGGCAG	199
NM_019130	Ins2	INS2	TGTGGTTCTCACTTGGTGGA	CAGTGCAAGGTCTGAAGGT	155
NM_031693	SytlV	SYTIV	CATGTTTTCTGCGTGCTCTG	GGTGGCACATTGCTGATAGA	168
NM_031799	Pax4	PAX4	GACGGTCTCAGCAGTGTGAA	CTGTAGTGCCCGAAGGACTC	386
NM_013001	Pax6	PAX6	TCCCAGGGATCTGAGAATTG	CAAAGACACCAAGCTGA	406
AF_004431	Nkx6-1	NKX6-1	TTCTTCCTCCTCCTCCTCGT	CGACCTAACACGAAAAAGTC	660
NM_012879	Slc2a2	GLUT2	TTCAGATTGCTGGCCTCAG	TTCTTTGCCCTGACTTCTCTC	165
NM_012751	Slc2a4	GLUT4	GTGCCTTGGGAACACTCAAC	GGTCCAAGGCCTACT	200
NM_012659	Sst	SST	TCAAGCTCGGCTGTCTGAG	AGGTCTGCCAACTCGAACC	307
NM_007393	Actb	ACTB	TTTGGGAGGGTGAGGGACTTC	TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGG	504

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L de reação, utilizando-se, aproximadamente, 300 ng/ μ L de cDNA como *template*. As reações de PCR continham: 1x PCR buffer (GIBCO *Life Technologies*), 1,5 mM de MgCl₂ (GIBCO *Life Technologies*), 0,2 mM dNTP Mix (GIBCO *Life Technologies*), 0,5 μ M de cada primer e 1 U de Taq DNA *Polymerase* (GIBCO *Life Technologies*) e 5 mM de betaína para evitar ligações inespecíficas. Para amplificação dos fragmentos foi utilizado um termociclador (*Mastercycler gradient* - Eppendorf). Em todas as reações, foi realizado um controle negativo. A expressão de β -actina foi utilizada como controle interno endógeno em todas as reações de PCR.

3.8.1. Padronização dos Genes

3.8.1.2. Gradiente de Temperatura

A partir dos cDNAs obtidos, foram realizadas as curvas de gradiente de temperaturas, para obtenção da temperatura adequada de amplificação de cada gene. Os genes de estudo (Tabela II) foram submetidos a 35 ciclos de amplificação nas temperaturas de 55, 57, 59 e 62 °C, como exemplo demonstrado na Figura 12 amplificação do gene Actb. Para a padronização de todos os genes acima foram utilizadas amostras de cDNA de diferentes tecidos de ratos Wistar controle (grupo controle).

Figura 12 : Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNA de Actb amplificado por RT-PCR em diferentes temperaturas de *annealing*. A amplificação foi realizada em 35 ciclos utilizando-se amostras de cDNA de fígado de ratos controles.

Legenda: (1) 55 °C de temperatura; (2) 57 °C de temperatura; (3) 59 °C de temperatura; (4) 62 °C de temperatura; 65 °C e (B) branco.

3.8.1.3. Curva de Ciclagem

A curva de ciclos para cada *primer* específico (Tabela II) foi construída utilizando-se como ponto inicial 20 ciclos e ponto final de 45 ciclos de amplificação, sendo a diferença entre os pontos de 5 ciclos para cada curva de cada gene. Por exemplo: 20, 25, 30 ciclos, etc, como demonstrado na Figura 13 com o gene Actb. Após obtenção das curvas, os experimentos foram realizados com o número de ciclos equivalente a dois pontos antes da saturação da curva (platô). O ponto de saturação é obtido quando a diferença entre os pontos é inferior a 20%.

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos de cDNA de Actb amplificados por RT-PCR em diferentes ciclos de amplificação.

Legenda: (1) 20 ciclos de amplificação; (2) 25 ciclos; (3) 30 ciclos; (4) 32 ciclos; (5) 35 ciclos; (6) 40 ciclos; (7) 45 ciclos; (B) branco.

3.9. Análise por PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L de reação, utilizando-se aproximadamente 2,0 μ g de cDNA como *template*. As reações de

PCR continham: 1x PCR *buffer* (GIBCO *Life Technologies*), 1,5 mM MgCl₂ (GIBCO *Life Technologies*), 0,2 µM dNTP Mix (GIBCO *Life Technologies*), 0,2 µM de 10 µM de cada primer e 1 U de Taq DNA *Polymerase* (GIBCO *Life Technologies*). Foi preparado um Pré-Mix com as soluções descritas anteriormente, num volume referente ao número de amostras a serem submetidas à reação de PCR, para diminuir o erro de pipetagem. O ciclo ótimo de amplificação foi determinado para cada gene, utilizando-se uma curva, como descrita anteriormente, com as amostras do grupo controle.

A reação teve seu início, submetendo as amostras, durante 5 min a 94° C, para a separação das duplas fitas de cDNA. A amplificação de Thy1.1, HGF, Vimentina, Krt-19, CD45, CD11c, foi obtida em termociclador, utilizando-se 40 ciclos, cada um deles compostos de 30 s a 94° C, 30 s a 57° C, e 45 s a 72° C. Após o último ciclo, foi realizada a etapa de alongamento do fragmento obtido, por 4 min, a 72° C. A amplificação dos genes Actb, insulina 1 e 2, Glut2, Pdx-1, Pax-4, Pax-6, Nkx-6.1, glucagon e somatostatina foi obtida com 40 ciclos, contendo os mesmos passos descritos anteriormente. Em todos os casos, foi realizado um controle negativo da reação submetendo uma amostra com água para amplificação. No caso dos genes expressos em ilhotas, foi utilizado como controle positivo de cada reação, amostra de cDNA de ilhotas pancreáticas de ratos Wistar controle. A expressão de Actb foi utilizada como controle interno em todas as reações de PCR.

3.10. Análise Estatística

Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste Sheffé. A significância estatística foi fixada para $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da Proliferação das Células Ovais Hepáticas

A proliferação das COH foi confirmada, como mostra a Figura 14 em corte histológico corado com HE de fígado de animais tratados por 9 dias com 2AAF/AA, na região dos ductos hepáticos, em comparação aos corte de tecido hepático de animais controles (Figura 14A e 14C). As COH, como demonstrado na Figura 14B e 14D apresentam-se em pequeno tamanho se comparadas aos hepatócitos normais, com o núcleo grande em relação ao citoplasma e de formato oval.

Figura 14: Análise anátomo-patológica de tecido hepático de ratos Wistar controles e tratados com 2AAF/AA. Note a ausência de proliferação de células ovais hepáticas na região dos ductos de animais controles **(A)**. As COH apresentam-se em grande quantidade no grupo 2AAF/AA **(B)** coradas em roxo, nas regiões ductulares (setas).

Legenda: CTRL animais controles. 2AAF/AA animais tratados. Aumento de 10X (A, B), Aumento 20X (A1 e A2, B1 e B2).

4.2. Confirmação Genética da Proliferação das Células Ovais Hepáticas

A extração do RNA total de tecido hepático de ratos Wistar controles e tratados com 2-AAF (25 mg/dia) durante 2, 4, 7 e 9 dias,

O aumento concomitante tempo-dependente de Thy1.1, Krt19 e conseqüente diminuição de HGF em fígados de ratos Wistar tratados com 2-AAF (25 mg/dia) por 2, 4, 7 e 9 dias estão representados nas Figuras 15 e 16 . Foi detectado por RT-PCR um aumento na expressão de Thy1.1 e Krt19 em resposta ao tempo de tratamento com 2-AAF. Foi detectado, entretanto, uma redução na expressão de HGF nos mesmos grupos experimentais, em comparação ao grupo controle. A amplificação de Actb foi utilizada como controle interno em todas as reações de PCR e estas foram realizadas utilizando-se 35 ciclos de amplificação.

Figura 15: Expressão de Thy1.1 e HGF em fígado de ratos Wistar tratados com 2-AAF por 2, 4, 7 e 9 dias.

Ratos Wistar foram tratados com 2-AAF por 2, 4, 7 e 9 dias. Todos os animais receberam dose única de álcool amílico (AA) (1 mL). Após RT-PCR (35 ciclos de amplificação) e eletroforese dos produtos amplificados em gel de agarose 2% detectou-se um aumento na expressão de Thy 1.1 em resposta ao tempo de tratamento com 2-AAF. Foi verificada, entretanto, uma redução na expressão de HGF nos mesmos grupos experimentais.

Legenda: (C) Ratos controle, (2d) Ratos tratados com 2-AAF por 2 dias, (4d) Ratos tratados por 4 dias, (7d) Ratos tratados por 7 dias e (9d) Ratos tratados por 9 dias.

Figura 16: Expressão de concomitante de Thy1.1 e Krt19 em fígado de ratos Wistar tratados com 2-AAF por 2, 4, 7 e 9 dias.

Legenda: (C) Ratos controle, (2d) Ratos tratados com 2-AAF por 2 dias, (4d) Ratos tratados por 4 dias, (7d) Ratos tratados por 7 dias e (9d) Ratos tratados por 9 dias.

4.3. Caracterização das Células Ovais Hepáticas Isoladas

As características morfológicas da preparação de células isoladas após cada passo do processo utilizado estão ilustradas na Figura 17. As frações de células isoladas somente após centrifugações específicas apresentam vários tipos celulares; como demonstrado na Figura 17A. As células isoladas após separação com gradiente de Ficoll apresentam-se como uma preparação mais homogênea de células, porém ainda se observam células com várias características morfológicas diferentes (Figura 17B). A Figura 17C demonstra a ligação das células com tamanho compatível com células ovas com as esferas magnéticas Dynalbeads® Thy1.1. Finalmente, após o isolamento imunomagnético, observa-se uma população bastante homogênea de células com características morfológicas compatíveis com células ovas hepáticas (Figura 17D).

Figura 17: Ilustração do processo de isolamento das células ovais hepáticas

Legenda: Frações de células isoladas somente após centrifugações específicas (A), células isoladas após separação com gradiente de Ficoll (B), ligação das células com tamanho compatível com células ovais com as esferas magnéticas Dynalbeads® Thy1.1 (C) finalmente após o isolamento imunomagnético, a população bastante homogênea de células com características morfológicas compatíveis com células ovais hepáticas (D). Aumento 100X (A, B e D) e 200X (C).

O gel representativo da análise por RT-PCR da expressão gênica de Thy1.1, CD11c e CD45 em extratos de células obtidos após a separação magnética, utilizando-se esferas magnéticas Dynalbeads® Thy1.1(separação positiva) e em extratos de células que não se ligaram às esferas magnéticas (separação negativa) está demonstrado na Figura 18. Foi detectada uma maior expressão de Thy1.1 nas frações de células que se ligaram especificamente às esferas magnéticas enquanto houve uma menor expressão de CD11c e CD45 nestes extratos celulares. A expressão de CD11c assim como de CD45 foi significativamente maior nos extratos de células que não se ligaram às esferas magnéticas (separação negativa), se comparadas àquelas que se ligaram especificamente às Dynalbeads® Thy1.1. Os dados de cada grupo experimental estão demonstrados em unidades arbitrárias de densitometria óptica (UADO) e estão apresentados como mediana $\pm$ intervalo interquartilico. Os resultados demonstrados para Thy1.1, CD11c e CD45 são representativos de 3 experimentos independentes (*: $p < 0.05$).

Figura 18: Gel representativo da análise por RT-PCR da expressão gênica de Thy1.1, CD11c e CD45 em extratos de células obtidos após a separação magnética, utilizando-se esferas magnéticas Dynalbeads® Thy1.1.

Legenda: Extratos de células obtidos após separação magnética: células que se ligaram às esferas magnéticas Thy1.1 (separação positiva +) e extratos de células que não se ligaram às esferas magnéticas Thy1.1 (separação negativa -). Os dados de cada grupo experimental estão demonstrados em unidades arbitrárias (UADO) e estão apresentadas como mediana±intervalo interquartilico. Os resultados demonstrados para Thy1.1, CD11c e CD45 são representativos de 3 experimentos independentes (*: $p < 0.05$).

4.4. Resultados da Indução da Trans-diferenciação das Células Ovais Hepáticas em Resposta às Diferentes Condições de Cultivo

CTRL 30 e CTRL 60

A expressão gênica de Thy1.1 foi detectada por RT-PCR quando as COH foram cultivadas por 30 e 60 dias somente na presença de meio de cultura, sem a adição de fatores de crescimento ou qualquer outro fator estimulante, como mostra a Figura 19. A expressão do gene HGF, expresso pelas células mesenquimatosas e dos genes Pdx-1, Pax-4, Pax-6, Nkx-6.1, insulina 1 e 2, Glut4, somatostatina e Glut2, característicos das células das ilhotas pancreáticas, não foram, no entanto detectados quando as COH foram cultivadas nestas condições. A expressão gênica de Actb foi utilizada como um controle positivo em todas as reações de PCR.

FC 30 e FC 60

Quando as COH foram cultivadas por 30 dias na presença de fatores de crescimento específicos (FC 30) foi detectado por RT-PCR a expressão gênica de insulina 2 e Glut4, como mostra a Figura 19. Ainda, quando as COH foram cultivadas, nas mesmas condições descritas anteriormente, porém por um período de 60 dias (FC 60), os fatores de transcrição Pdx-1, Pax-6, a insulina 1 e insulina 2 e o Glut4 foram detectados por RT-PCR, como também demonstrados nesta Figura. A expressão gênica de Thy1.1, HGF, Pax-4, Nkx-6.1, somatostatina e

Glut2, não foram no entanto, detectadas por RT-PCR quando COH foram cultivadas por 30 e 60 dias na presença de fatores de crescimento específicos. A expressão gênica de Actb foi utilizada como um controle positivo em todas as reações de PCR.

FC+ ADJ 30 e ADJ 30

A expressão gênica de Pdx-1, insulina 1, insulina 2 e Glut4 foi detectada por RT-PCR quando as COH foram cultivadas por 30 dias na presença de fatores de crescimento específicos e mais 30 dias na presença de fatores adjuvantes, ou seja, em altas concentrações de glicose e nicotinamida como demonstrado na Figura 19. Ainda, quando as COH foram cultivadas somente sob fatores adjuvantes por um período de 30 dias (ADJ 30), foi possível detectar somente a expressão do gene insulina 2. A expressão gênica de Thy1.1, HGF, Pax-4, Pax-6, Nkx6-1, somatostatina e Glut2, no entanto, não foram detectadas por RT-PCR nas COH cultivadas por 30 dias na presença de fatores e mais 30 dias sob estímulo (FC 30 + ADJ 30), e nas condições de somente fatores adjuvantes (ADJ 30d). A expressão gênica de Actb foi utilizada como um controle positivo em todas as reações de PCR.

FN 30

Quando as COH foram cultivadas somente na presença de substrato celular de fibronectina por 30 dias a expressão dos genes HGF, Pdx-1, Pax-6, insulina 2 e Glut4 foram detectados por RT-PCR como mostra a Figura 19. Não foi possível

detectar, no entanto, a expressão gênica de Thy1.1, Pax-4, insulina 1, Nkx6-1, somatostatina e Glut2 quando as COH foram cultivadas nestas condições.

FC+FN 30

COH cultivadas na presença de substrato celular de fibronectina por 30 dias em combinação com fatores de crescimento específicos, como demonstrado na Figura 19 pareceu promover somente a expressão gênica de Pdx-1 e insulina 2. A expressão gênica de Thy1.1, HGF, Pax-4, Pax-6, Nkx6-1, somatostatina e Glut2, no entanto, não foram detectadas por RT-PCR nas COH cultivadas nestas condições.

FC+ FN+ ADJ 30

.Somente a expressão do gene Glut4 foi detectada quando as COH foram cultivadas na presença de fibronectina por 30 dias em combinação com fatores de crescimento específicos e por mais 30 dias sob fatores adjuvantes de altas concentrações de glicose e nicotinamida. A expressão de mRNA de Actb foi utilizada como um controle positivo em todas as reações de PCR.

LAM 30 e FC+LAM 30

Quando as COH foram cultivadas somente na presença de substrato celular de laminina por 30 dias (LAM 30) a expressão dos genes HGF, Pdx-1, insulina 1, insulina 2, Glut4, Glut2 e somatostatina foram detectados por RT-PCR como mostra a Figura 19. Não foi possível detectar, no entanto, a expressão de mRNA de Thy1.1, Pax-4, Pax-6, Nkx6-1 quando as COH foram cultivadas por 30 dias na

presença de laminina. Ainda, COH cultivadas na presença de substrato celular de laminina por 30 dias em combinação com fatores de crescimento específicos, como demonstrado na Figura19 (FC+LAM 30) pareceu promover a expressão dos mesmos genes descritos na condição anterior. A expressão de mRNA de Thy1.1, Pax-4 e Pax-6, Nkx-6.1, no entanto, não foram detectadas por PCR nas COH cultivadas por 30 dias na presença de laminina (LAM 30), e nas condições FC+LAM 30. A expressão de mRNA de Actb foi utilizada como um controle positivo em todas as reações de PCR.

Figura 19: Gel representativo da análise por RT-PCR da expressão de mRNA de Thy1.1, HGF, Pdx-1. Pax-4, Pax-6, Insulina 1, Insulina 2, Glut4, Somatostatina, Glut2 e Actb em extratos de células obtidos após cada fase e condição de cultivo específicos.

Legenda: **CTRL 30** e **CTRL 60:** COH mantidas por 30 e 60 dias, respectivamente, sem adição de quaisquer fatores de crescimento; **FC 30** e **FC 60:** COH mantidas por 30 e 60 dias, com adição de fatores de crescimento específicos; **FC+ADJ 30:** COH mantidas por 30 dias na presença de fatores específicos e mais 30 dias na presença de fatores adjuvantes; **ADJ 30:** COH mantidas por 30 na presença de fatores adjuvantes; **FN 30:** COH mantidas por 30 dias sobre substrato de fibronectina; **FC+FN 30:** COH mantidas por 30 dias sobre fibronectina e com fatores de crescimento; **FC+FN+ADJ 30:** COH mantidas por 30 dias na presença de fatores específicos e sobre fibronectina e mais 30 dias na presença de fatores adjuvantes; **CRTL LAM 30:** COH mantidas por 30 dias sobre substrato de laminina e finalmente **FC+LAM 30:** COH mantidas por 30 dias sobre laminina e com fatores de crescimento.

5. DISCUSSÃO

A utilização de células-tronco é a grande promessa para a reparação de tecidos. O fato do pâncreas e do fígado terem uma origem comum durante a embriogênese (endoderma do intestino) explica o interesse em se redirecionar o destino de células hepáticas adultas para células pancreáticas, especialmente células β .⁵¹ Estudos evidenciam que, após indução de sua proliferação pela lesão hepática grave, células ovas hepáticas são capazes de se trans-diferenciar em vários tipos celulares, tais como hepatócitos,⁵² células do epitélio biliar,⁵³ células intestinais⁵⁴ e células endócrinas pancreáticas,⁵⁵ apresentando potencial de utilização em terapia celular.⁵⁶ A COH apresenta algumas características que a tornam muito interessantes como precursora de células pancreáticas: (1) expressão de vários fatores de transcrição comuns ao tecido pancreático (HNF1 α , HNF 1 β , HNF3 α , HNF3 β , C/EBP α), alguns deles importantes na indução e regulação da expressão do gene da insulina; (2) expressão de conexina 43, uma proteína com propriedades de *gap junction* e que está presente nas ilhotas pancreáticas, onde exerce papel fisiológico importante na secreção hormonal^{8, 9},

⁵⁷; (3) capacidade já demonstrada de expressar genes da ilhota quando cultivadas em meio rico em glicose.

O presente estudo demonstra em um primeiro momento o resultado da padronização de um método alternativo de obtenção de COH induzido pelo tratamento prolongado com AAF, seguido da administração única de AA, sem a necessidade de submeter o animal a hepatectomia; procedimento cirúrgico comumente utilizado na obtenção de COH o qual requer técnicas especiais. Petersen et al. 1998 ⁵⁸ previamente demonstrou por imunocitoquímica o aumento da expressão de AFP em fígados de ratos Wistar tratados com 2AAF/AA, sem submeter o animal a hepatectomia. Nossos dados confirmam a eficiência deste tratamento, por RT-PCR, com a detecção do aumento tempo-dependente do conteúdo de RNAm de Thy1.1 e Krt19 em resposta a administração de 2AAF.

O isolamento de COH é normalmente feito pela técnica de citometria de fluxo, procedimento que depende de equipamentos específicos e da utilização de anticorpos muitas vezes não disponíveis no mercado, dependendo do tipo celular a ser estudado. Neste estudo propusemos um método alternativo de isolamento de COH pela utilização de esferas magnéticas Dynalbeads® Thy1.1. As características principais desta metodologia alternativa de isolamento são sua simplicidade, eficiência e baixo custo, não necessitando de equipamentos especiais nem tão pouco da aquisição de anticorpos específico, já que as esferas são capazes de reconhecer os epítopos de Thy1.1 presentes na superfície de membrana das COH. Confirmando pela baixa expressão do conteúdo de RNAm de CD11c, marcador presente em células hematopoiéticas, analisada por RT-PCR nas frações de células separadas positivamente pelas esferas magnéticas

Dynalbeads® Thy1.1, mesmo em 40 ciclos de amplificação. Logo, tais dados permitiram a obtenção de uma população enriquecida e purificada de COH.

A trans-diferenciação de COH em células semelhantes às ilhotas pancreáticas, da forma até o momento demonstrada, requer a manutenção das células em cultura durante mais de oito meses, na presença de fatores de crescimento específicos e em altas concentrações de glicose e nicotinamida. O presente estudo demonstra em um segundo momento, que culturas de COH purificadas são induzidas a trans-diferenciar em células semelhantes às células endócrinas pancreáticas em um menor período de tempo quando cultivadas em condições específicas. A grande maioria das linhas de pesquisa sobre indução da diferenciação de células-tronco em linhagens celulares específicas está focada no estudo de fatores de crescimento específicos e agentes bioreativos.⁵⁹ No entanto, existem poucos dados relacionados ao estudo do papel de componentes de matriz extracelular nos processos de diferenciação de células-tronco “in vitro”.

Até o momento, estão descritos alguns fatores de transcrição envolvidos especificamente no desenvolvimento pancreático (Pdx1, Pax4, Pax6, Islet1, Beta2, NeuroD1, Nkx2.2, Nkx6.1, HexB9, Neurogenina (NGN3), Proteína p48).⁶⁰, como exemplificado na Figura 16.

Figura 20: Fatores de transcrição, até o momento descritos, relacionados com o desenvolvimento pancreático.

No processo natural de diferenciação de uma célula pancreática precursora em células exócrinas, células ductais, células α , células β e células δ ; é sabidamente conhecido que o primeiro fator de transcrição a ser expresso neste processo de diferenciação é o Pdx-1. Estudos revelam que a expressão isolada de

Pdx-1 parece favorecer a diferenciação da célula precursora pancreática tanto em células exócrinas, como em células ductais. A diferenciação em células α , por sua vez parece depender da expressão de outros fatores de transcrição, como Beta2, NeuroD1, após expressão de Pdx-1. Já a diferenciação completa em células β , por se tratar de uma célula bastante especializada no pâncreas endócrino, depende, muito provavelmente, do aparecimento gradual dos fatores de transcrição, Pdx-1, Beta2, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax-4, Pax-6, novamente expressão de Pdx-1 e finalmente Islet1.⁶⁰

O cultivo de células-tronco na presença de matriz extracelular, como a fibronectina e a laminina parecem exercer um papel crucial no controle e no direcionamento da diferenciação celular, assim como atuando no crescimento celular por rearranjos no citoesqueleto das células.^{61, 62} Estudos comprovam que o cultivo de células-tronco embrionárias humanas sobre substrato celular de fibronectina parece promover a trans-diferenciação “in vitro” destas células em clusters produtores de insulina.⁶³ Ainda, dados da literatura revelam que o cultivo por 7 dias de células pancreáticas fetais de camundongos na presença de laminina promove diferenciação de células β pancreáticas.⁶⁴

Tais relatos estão de acordo com nossos achados, uma vez que análises por técnica de RT-PCR das COH mantidas por 1 mês em meio livre de soro e na presença de substrato celular de fibronectina revelaram o aparecimento de genes transcripcionais, como por exemplo Pdx-1, gene responsável pela transcrição da insulina e Pax-6 gene responsável pela transcrição da célula β , assim como a insulina 2.⁶⁵

Do mesmo modo que agentes de matriz extracelular, como a laminina promove a diferenciação “in vitro” de células fetais pancreáticas, este mesmo componente pareceu acelerar o processo de diferenciação celular de COH em apenas 1 mês de cultivo, quando combinamos o cultivo de COH com os mesmos fatores de crescimento utilizados para esta trans-diferenciação, como anteriormente descrito por Yang et al. 2002 , porém na presença de laminina, detectamos por técnicas de RT-PCR a expressão de mRNA de Pdx-1, insulina 1 e 2, Glut2 e somatostatina e o desaparecimento da expressão de Pax-6. Estudos comprovam que a expressão dos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento pancreático deve seguir uma linha de diferenciação. No caso das COH cultivadas em fibronectina com o aparecimento da expressão de Pdx-1 e Pax6 e no caso das COH cultivadas na presença de laminina a expressão de Pdx-1, insulina 1 e insulina 2, somatostatina e Glut2 confirmam que estes agentes de matriz extracelular estariam promovendo uma diferenciação celular favorável, com maior rapidez e seguindo um caminho de acordo com aquele seguido por uma célula-tronco pancreática para diferenciação em células endócrinas pancreáticas devido o aparecimento da expressão de desses fatores de transcrição já descritos. No entanto, nessas condições experimentais, a detecção de genes característicos das células hepáticas, tais como o HGF e Glut4, poderia evidenciar que o processo de trans-diferenciação não se completou. Estudos evidenciam que células hepáticas ductais cultivadas na presença de fibronectina juntamente com fatores de crescimento; tais como “stem cell factor” , HGF e EGF promovem a diferenciação dessas células em hepatócitos.⁶⁶ Logo, a expressão desses genes poderia estar relacionada à origem hepática da célula-tronco utilizada.

O cultivo de COH somente na presença de fatores de crescimento específicos, segundo Yang et al. 2002 promove, somente após seis a oito meses de cultivo o aparecimento da expressão de mRNA de insulina 1 e 2, somatostatina e Glut2. De acordo com nossos achados, o cultivo por apenas 1 mês de COH na presença destes mesmos fatores de crescimento já promovem o aparecimento da expressão de mRNA de insulina 2.

O cultivo de COH sobre substratos de matriz extracelular parece deslocar etapas do processo de diferenciação celular que normalmente deveriam ocorrer. Quando as COH foram cultivadas sobre substrato celular de laminina na presença com fatores de crescimento anteriormente utilizados por Yang et al. 2002 observamos uma aparente diminuição na expressão de HGF, como também a persistência dos marcadores de células endócrinas pancreáticas (Figura 15). Dessa forma essa condição experimental poderia ser considerada a mais apropriada para a obtenção “in vitro” de células semelhantes à ilhotas pancreáticas.

Estudos revelam que o fator de transcrição Nkx6.1 está restritamente relacionado com a diferenciação terminal de células β , assim como na expressão do gene da insulina. Interessantemente no caso das COH, mesmo não detectando expressão de Nkx6.1 em nenhuma de nossas preparações, fomos capazes de detectar a expressão de insulina 2 em COH cultivadas com fatores de crescimento específicos, na presença de fibronectina e na presença de glicose e nicotinamida, não detectamos, no entanto a expressão de insulina 1 nem mesmo de Glut2.

Logo, parece claro que o processo de diferenciação celular de COH em células endócrinas pancreáticas, não é um fenômeno simples e sim um processo que envolve a combinação de funções exercidas pela matriz extracelular, neste caso pela presença de fibronectina e laminina, assim como de fatores de crescimento que ora estimulam, ora inibem o processo de diferenciação. Ainda, por se tratarem de células-tronco não pancreáticas e portanto diferentes, as COH parecem seguir caminhos semelhantes, porém não idênticos para atingir uma diferenciação celular completa de células semelhantes às ilhotas pancreáticas.

Perspectivas futuras para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos e dos fatores de crescimento envolvidos no processo de diferenciação em células secretoras de insulina deverão se basear no estabelecimento de um sistema de manutenção celular cada vez mais parecido ao o que ocorre “in vivo”, uma vez que os fatores endógenos, de sinalização intercelular, por exemplo são essenciais para a diferenciação completa para uma célula β pancreática funcional

6. CONCLUSÕES

- 1) A expressão de mRNA aumentada de Thy1.1 Krt19 e diminuída de HGF confirmam a eficiência do tratamento prolongado com 2AAF seguida por injeção de AA.
- 2) A baixa expressão de mRNA de CD11c em todos os extratos celulares e uma expressão significativa de CD45 somente nas frações de células que não se ligaram às esferas magnéticas evidenciam que obtivemos preparações enriquecidas de COH.
- 3) A detecção da expressão de mRNA de Pdx-1, Pax-6 e insulina 2, confirmam que em apenas 1 mês de cultivo na presença de substrato de fibronectina e fatores de crescimento específicos, já foi possível induzir a trans-diferenciação de COH em células endócrinas pancreáticas.
- 4) A detecção da expressão de mRNA de Pdx-1, insulina 1 e 2, Glut2 e somatostatina confirmam que em apenas 1 mês de cultivo sobre substrato de laminina e na presença fatores de crescimento específicos, já foi

possível induzir a trans-diferenciação de COH em células endócrinas pancreáticas.

7. ANEXOS

Mediators Inflamm. 2004 Jun;13(3):211-229(19).

EXPOSITION TO 2-AAF PROMOTES INCREASE IN THE EXPRESSION OF HEPATIC OVAL CELL MARKERS.

Leite AR, Corrêa-Giannella MLC, Fortes MAHZ, Cavaleiro AM, Giannella-Neto D.

INTRODUCTION: Stem cells have the capability to differentiate into several cells types either in vitro or in vivo. The use of embryonic stem cells for medical purposes has been hampered by ethical questions; however, adult tissues stem cells are considered as equally important for replacement therapy. Hepatic oval cells are tissue stem cells found in the liver after inhibition of hepatocytes proliferation or following liver injury. Recent studies have shown that, in special culture conditions, these cells are capable to transdifferentiate in vitro into pancreatic endocrine cells, however, its use for diabetes mellitus treatment is not established. Proliferation of hepatic oval cells, which express the membrane protein Thy1.1, can be induced by 2-acetamidofluorene (2-AAF) administration.

OBJECTIVE: To study the increase of hepatic oval cells proliferation, in Wistar rats, in response to 2-AAF treatment for subsequent cellular isolation and trans-differentiation in vitro.

METHODOLOGY: Proliferation of hepatic oval cells was induced by daily administration of 2-AAF (25 mg/day) during 2, 4, 7 and 9 days. Total RNA was

isolated from livers removed from treated and untreated animals and Thy1.1 and HGF gene expression were detected by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: A time-dependent increase in Thy1.1 and decrease in HGF gene expression was detected in Wistar rats treated with 2-AAF for 2, 4, 7 and 9 days when compared to control group.

CONCLUSION: These results indicate that prolonged treatment with 2-AAF in Wistar rats promotes a decrease in the number of normal hepatocytes and consequently an increase on hepatic oval cells proliferation. A prolonged liver exposition to 2-AAF can potentiate the hepatic oval cell obtention for post cellular trans-differentiation in vitro.

SUPPORTED BY: FAPESP

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harris MI. Newly revised classification and diagnostic criteria for Diabetes melito. In: Taylor S, ed. Current review of Diabetes Philadelphia, PA: Current Medicine, Inc; 1999:1-9.
2. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of Diabetes melito and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Diabetes Care, 1992;15:1509-16
3. Torquato MTCG e cols, 17 International Diabetes Federation Congress. Ciudad de Mexico, 2000.
4. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 Diabetes: resolved and unresolved issues. J Clin Invest 2001; 108: 1247-1252.
5. Resnick HE, Brock DB, Harris MI, Harris TB. American Diabetes association Diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease risk proliles. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetes Care 2000; 23: 176-180.
6. Mokdad AH, Englgau MM, Ford ES, Vinicor F, Bowman BA, Marks JS, Nelson DE. Diabetes trends in the U.S: 1990-1998. Diabetes Care 2000; 23:1278-1283.

-
7. Edlund H. Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. *Diabetologia* 2001; 44: 1071-1079.
 8. Leite AR, Carvalho CP, Furtado AG, Barbosa HC, Boschero AC, Collares-Buzato CB. Co-expression and regulation of connexins 36 and 43 in cultured neonatal rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Feb;83(2):142-151.
 9. Collares-Buzato CB, Leite AR, Boschero AC. Modulation of gap and adherens junctional proteins in cultured neonatal pancreatic islets. *Pancreas* 2001; 23: 177-185.
 10. Meda P. Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clinical and Exp Pharmacol Physiol* 1996; 26:1053-1057.
 11. Berná G, León-Quinto T, Ensenāt-Waser R et al. Stem cells and Diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001;55: 206-12.
 12. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with type I Diabetes melito using a glucocorticoid -free imunossuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000, 343: 230-8.
 13. Gruessner AC, Sutherland DE. Pancreas transplant outcomes for United States (US) cases reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and non-US cases reported to the International Pancreas Transplant. Registry (IPTR). *Clin Transpl* 2000: 45-72.
 14. Landgraf R. Impact of pancreas transplantation on diabetic secondary complications and quality of life. *Diabetologia* 1996; 39:1415-1424.
 15. Manske CL. Risks and benefits of kidney and pancreas transplantation for diabetic patiens. *Diabetes Care* 1999; 22: B114-120.

-
16. Soria B, Andreu E, Berna G, Fuentes E, Gil A, Leon-Quinto T, Martín F, Montanya E, Nadal A, Reig JÁ, Ripoll C, Roche E, Sandrez-Andrés JV, Segura J. Engineering pancreatic islets. *Pflügers Arch* 2000; 440: 1-18.
 17. Matheus CE, Langley SH, Leiter EH. New model to study islet transplantation in insulin-dependent Diabetes melito. *Transplantation* 2002; 73: 1333-1359.
 18. Pipeleers D, Keymeulen B, Korbitt G. Islet transplantation. *The Diabetes Annual* 1994: 299-330.
 19. Pipeleers D, Keymeulen B, Chatenoud L, Hendrieckx C, Ling Z, Mathieu C, Roep B, Ysebaert D. A view on beta cell transplantation in Diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2002; 958:69-76.
 20. Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ, Latta PP, Hegre OD, Doherty EJ, et al. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I Diabetes or type II Diabetes and non-diabetic control subjects. *Diabetes* 1994; 43: 1167-70.
 21. Hering BJ, Ricordi C. Islet transplantation in type I Diabetes: results, research priorities and reasons for optimism. *Graft* 1999; 2:12-27.
 22. Wagers AJ and Weissman IL. Plasticity of adult stem cell. *Cell*. 2004, 116:639-648.
 23. Trucco M. Regeneration of the pancreatic b cell. *J Clin Invest* Review 2005; 115:5-12.
 24. Stem cell research and ethics. *Science* 2000; 287: 1417-46.
 25. Lumelsky N, Boldel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, Mckay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic

-
- islets. *Science* 2001; 292:1389-1394.
26. Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49:157-162.
27. Leite AR. Regulação das junções comunicantes Gap Junctions pela cultura de ilhotas pancreáticas de ratos recém-nascidos. Tese de Mestrado. UNICAMP 2002.
28. Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *PNAS Early Edition* 2002: 1-6.
- 29 Rosenberg, L. In vivo cell transformation: neogenesis of β cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant.* 1995, 4, 371–383.
- 30 Bouwens, L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet β -cells in the pancreas. *Microsc. Res. Tech* 1998., 43, 332–336.
- 31 Edlund H. Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 2002., 3:524-32. Review
- 32 Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, Watada H, Fujitani Y, Kosaka H, Gotow T, Miyatsuka T, Umayahara Y, Yamasaki Y and Hori M. Pdx-1 Induces Differentiation of Intestinal Epithelioid IEC-6 Into Insulin-Producing Cells. *Diabetes* 2002, 51:2505–2513.
- 33 Serup P, Jensen J, Andersen FG, Jorgensen MC, Blume N, Holst JJ, Madsen OD. Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet

glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996; 93:9015–9020.

34 Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y. Pdx-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in α TC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. Diabetes 1996; 45:1826–1831.

35 Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. Hepatology, 1988; 27(2): 433-45.

36 Weiss MC, Strick-Marchand H.. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells in vitro. Semin Liver Dis. 2003, Nov;23(4):313-24. Review.

37 Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS, Alison MR.. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorenetreated regenerating rat liver. Hepatology, 1995, 22:1243–1253.

38 Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ.. Human hepatic stem like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. Gastroenterology, 2001, 120:534–544.

39 Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E. Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. Lab Invest, 1985, 52:354–362.

40 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic-endocrine

-
- hormone-producing cells. PNAS 2002, 99(12): 8078-8083.
41. Verfaillie CM. Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: a novel role for thrombopoietin. J Clin Invest 2002; 110: 303-304.
42. Weiss MC, and Strick-Marchand H. Isolation and Characterization of Mouse Hepatic Stem Cells in Vitro. Seminars in liver disease 2003; 23: 313-324.
43. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS and Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science. 1999;284:1168-1170.
44. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Hepatology 2000 31,235-240.
45. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Hepatology 2000;32,11-16.
46. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Nature Medicine 2000; 6,1229-1234.
47. Yavorkovsky L, Lai E, Ilic Z, Sell S. Participation of small intraportal stem cells in the restitutive of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. Hepatology 1999;21:1702-12.
48. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. Am J Pathol 2001;158:1313-23
49. Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GCT. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. Hepatology 2003;18:4-12.
- ⁵⁰ Leite AR, Corrêa-Giannella MLC, Fortes MAHZ, Cavaleiro AM, Giannella-Neto

D. Exposition To 2-AAF Promotes Increase In The Expression Of Hepatic Oval Cell Markers. *Mediators Inflamm.* 2004 Jun;13(3):211-229(19).

51 Polonsky KS& Bell GI. Organ alchemy: producing insulin in the liver. *Nature Medicine* 2003;9: 504-505.

52 Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS, Alison MR.. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorenetreated regenerating rat liver. *Hepatology* 1995, 22:1243–1253.

53 Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ.. Human hepatic stem like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001, 120:534–544.

54 Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E. Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest* 1985, 52:354–362.

55 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic-endocrine hormone-producing cells. *PNAS* 2002; 99(12): 8078-8083.

56. Verfaillie CM. Optimizing hematopoietic stem cell engraftment: a novel role for thrombopoietin. *J Clin Invest* 2002; 110: 303-304.

57 Charollais A, Gjinovci A, Huarte J, Bauquis J, Nadal A, Martin F, Andreu E, Sanchez-Andres JV, Calabrese A, Bosco D, Soria B, Wollheim CB, Herrera PL, Meda P. Junctional communication of pancreatic beta cells contributes to the

control of insulin secretion and glucose tolerance, *J. Clin. Invest.* 2000, 106: 235–243.

58 Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. 1998 Apr;27(4):1030-8.

59 Battista S, Guarnieri D, Borselli C, Zeppetelli S, Borzacchiello A, Mayol L, Gerbasio D, Keene DR, Ambrosio L, Netti PA. The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation.

60 M.E. Cerfa, C.J.F. Muller, D.F. Du Toit, J. Louw, S.A. Wolfe-Coote. Transcription factors, pancreatic development, and b-cell maintenance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 326: 699–702

61 Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, Apr 26;102(17):5953-7.

62 Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ, Harrison LC. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1999 Apr; 48(4):722-30.

63 Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 2004;22(3):265-74

64 Jiang FX, Georges-Labouesse E, Harrison LC. Regulation of laminin 1-induced pancreatic beta-cell differentiation by alpha6 integrin and alpha-dystroglycan. *Mol Med*. 2001 Feb;7(2):107-14.

65 Brink C. Promoter elements in endocrine pancreas development and hormone regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Jun;60(6):1033-48.

66 Yin L, Lynch D, Ilic Z, Sell S. Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCl₄/2-AAF injury. *Histol Histopathol.* 2002 Jan;17(1):65-81.

⁶⁷ Li-Zhen Cao,¹ Dong-Qi Tang,¹ Marko E. Horb,² Shi-Wu Li,¹ and Li-Jun Yang¹
High Glucose Is Necessary for Complete Maturation of Pdx1-VP16–Expressing Hepatic Cells into Functional Insulin-Producing Cells. 2004. *Diabetes* 53:3168–3178.