



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

MESTRADO

**GERAÇÃO DE CÉLULAS SEMELHANTES A HEPATÓCITOS POR
REPROGRAMAÇÃO DIRETA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

IASMIM DINIZ ORGE

**Salvador - Bahia
2019**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**GERAÇÃO DE CÉLULAS SEMELHANTES A HEPATÓCITOS POR
REPROGRAMAÇÃO DIRETA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS**

IASMIM DINIZ ORGE

Orientador: Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Co-orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para a
obtenção do título de Mestre.

**Salvador - Bahia
2019**

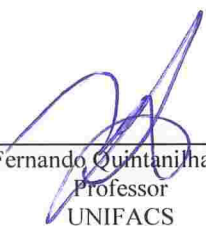
" GERAÇÃO DE CÉLULAS SEMELHANTES A HEPATÓCITOS POR REPORGRAMAÇÃO DIRETA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS."

IASMIM DINIZ ORGE

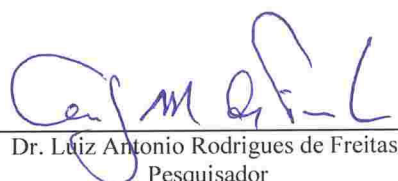
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 26 de fevereiro de 2019.

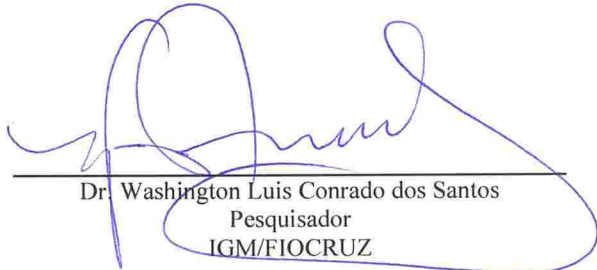
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luiz Fernando Quintanilha de Mesquita
Professor
UNIFACS



Dr. Luiz Antonio Rodrigues de Freitas
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“ O presente trabalho foi realizado como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

CNPq

FINEP

FAPESB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para concretização desse trabalho, e também aos que o empecilharam, pois é nos momentos de dificuldade que descobrimos o que realmente vale a pena na vida.

À minha família pelo suporte e apoio diário não só durante os últimos dois anos, mas desde o momento em que escolhi seguir a carreira acadêmica.

Agradeço aos orientadores Dr. Bruno Solano de Freitas Souza e Dra. Milena Botelho Pereira Soares, que estiveram presentes e tiveram papéis determinantes na minha trajetória acadêmica desde o início da graduação. Aos colaboradores e estudantes do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael e à FIOCRUZ-BA.

À toda equipe do Center for Regenerative Therapy – University of Edinburgh, em especial à Dra. Victoria Gadd e Dr. Stuart Forbes pela colaboração internacional.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que melhoraram meus dias e tornaram essa jornada muito mais prazerosa. Sem a ajuda profissional e pessoal de pessoas como Patrícia Damasceno, Gabriela Sampaio, Diogo Crispim, Daniela Nascimento, “Nobru” Paredes, Roquelina, entre muitos outros, a produção desse trabalho seria muito mais difícil e desagradável.

À equipe da biblioteca da FIOCRUZ-BA pela assistência na formatação do trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao destino por ter proporcionado um dos reencontros mais importantes da minha vida, que me incentivou nos momentos de insegurança e comemorou em cada pequena conquista.

ORGE, Iasmim Diniz. Geração de células semelhantes a hepatócitos por reprogramação direta de células-tronco mesenquimais. 2019. 72 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O transplante hepático permanece como o único tratamento eficaz disponível para hepatopatias graves. Entretanto, fatores como a escassez de órgãos viáveis e a rejeição imunológica limitam significativamente este tipo de terapia. O transplante de hepatócitos é uma opção terapêutica em estudo, contudo, a perda de funções metabólicas após técnicas convencionais de cultivo e a inabilidade de proliferar *in vitro* impedem a reprodução em larga escala deste tipo de procedimento. Devido a estes fatores, uma fonte extra e autóloga de hepatócitos poderia suprir essa carência. Estudos recentes apresentam as células-tronco mesenquimais (CTM) como uma fonte promissora de células hepáticas a partir de reprogramação direta com superexpressão de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento embrionário hepático. **OBJETIVO:** O presente estudo visou estabelecer um protocolo para geração de células semelhantes a hepatócitos, do ponto de vista morfológico, fenotípico e funcional, através da reprogramação direta de CTMs. **MÉTODOS:** A reprogramação hepática foi induzida a partir da superexpressão dos fatores de transcrição FOXA2 e HNF4 α através de sistema lentiviral de segunda geração e cultivo das CTM modificadas em meio de indução da diferenciação hepática contendo fatores como HGF, FGF-4 e EGF. As células reprogramadas foram caracterizadas fenotipicamente, ultra-estruturalmente e seu perfil de expressão gênica e propriedades funcionais foram avaliados. Protocolos utilizando *cell sorting* e pequenas moléculas foram estabelecidos para purificação e maturação da linhagem celular reprogramada. **RESULTADOS:** Após o cultivo em meio de indução da diferenciação hepática, foi observada a presença de colônias com morfologia epitelial característica de células que expressam marcadores de hepatócitos adultos, tais como albumina, tirosina aminotransferase (TAT) e alfa-1-antitripsina (AAT). A linhagem também apresentou características funcionais como capacidade de estocar glicogênio, lipídios, captação e depuração de indocianina verde, assim como expressão e atividade de enzimas do complexo citocromo P450. A análise ultraestrutural demonstrou características citoplasmáticas semelhantes às de hepatócitos primários como por exemplo o montante de conteúdo mitocondrial. A diferença de conteúdo mitocondrial entre células reprogramadas e CTM foi utilizada para purificação da linhagem por *cell sorting*. Após a etapa de maturação, foi observada o surgimento de células com aspecto de hepatócitos primários e de células com perfil de colangiócitos. **CONCLUSÃO:** O protocolo de reprogramação hepática direta desenvolvido mostrou-se eficiente e robusto, gerando células com propriedades hepáticas funcionais que podem ser utilizadas em plataformas de testes de toxicidade de drogas, estudos do desenvolvimento hepático, além de abrir perspectivas de novas alternativas terapêuticas para hepatopatias crônicas e agudas.

PALAVRAS-CHAVE: Células-tronco mesenquimais, Hepatócitos, Reprogramação direta, Maturação hepática.

ORGE, Iasmim Diniz. Generation of hepatocyte-like cells by direct reprogramming of mesenchymal stem cells. 2019. 72 f. il. Dissertation (Master's Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The liver transplantation remains the only effective treatment available for advanced liver diseases. Although, factors such as a shortage of viable organs and immune rejection significantly limit this type of therapy. The transplantation of hepatocytes is a therapeutic option in study, however, the loss of metabolic functions after conventional cultivation techniques and the inability to proliferate in vitro prevent large-scale reproduction of this type of procedure. Due to these factors, an extra source of autologous hepatocytes could address this need. Recent studies show the mesenchymal stem cells (MSC) as a promising source of liver cells from direct reprogramming by overexpression of transcription factors involved in the embryonic liver development. **OBJECTIVE:** The present study aims to establish a protocol for generation of hepatocyte-like cells, from the morphological, phenotypic and functional point of view, by direct reprogramming of mesenchymal stem cells (MSC). **METHODS:** The hepatic reprogramming process was induced by overexpression of the transcription factors FOXA2 and HNF4 α through a second-generation lentiviral system and culture of the modified CTM in hepatic differentiation medium containing factors such as HGF, FGF-4 and EGF. The reprogrammed cells were characterized phenotypically and ultrastructurally, and their gene expression profile and functional properties were evaluated. Protocols using cells sorting and small molecules were established for purification and maturation of the hepatocyte-like cell line generated. **RESULTS:** After culture in hepatic differentiation medium, we observed the presence epithelial-like cells, expressing adult hepatocyte markers, such as albumin, tyrosine aminotransferase (TAT) and alpha-1-antitrypsin (AAT). The cell lineage also presented functional characteristics such as capacity to store glycogen, lipids, uptake and clearance of indocyanine green, as well as expression and activity of cytochrome P450 enzymes complex. Ultrastructural analysis demonstrated cytoplasmic characteristics similar to those of primary hepatocytes, as the amount of mitochondrial content. The difference of mitochondrial content between reprogrammed cells and MSC was used for purification of the lineage by cell sorting. After the maturation stage, the emergence of cells with the appearance of primary hepatocytes and cholangiocyte-like cells was observed. **CONCLUSION:** The direct hepatic reprogramming protocol developed was efficient and robust generating cells with functional liver properties that can be used in drug toxicity testing platforms, liver development studies and open perspectives of new therapeutic alternatives for chronic and acute liver diseases.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Hepatocyte, Direct reprogramming, Hepatic maturation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Progenitores bipotentes geram progressivamente linhagens hepáticas.	23
Figura 2. Plasmídeos utilizados como fita molde para isolamento dos genes de interesse	29
Figura 3: Representação esquemática do protocolo utilizado para geração das iHEPs através de reprogramação direta de CTM.	34
Figura 4. Amplificação dos transgenes.	42
Figura 5. Construção dos vetores lentivirais para superexpressão dos genes	43
Figura 6. Digestão confirmatória do vetor pFOXA2 em gel de agarose 1%.....	44
Figura 7. Digestão confirmatória do vetor pFHIG em gel de agarose 1%.	44
Figura 8. Transfecção com o vetor pEGIP.	45
Figura 9. Transfecção com o vetor pFHIG.....	45
Figura 10. Aspecto morfológico das CTM da medula óssea de camundongos.....	46
Figura 11. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das CTM isoladas da medula-óssea de camundongos.	46
Figura 12. Avaliação de multipotência em CTM.	47
Figura 13. Seleção de clones transduzidos através da resistência à puromicina.	47
Figura 14: Colônias com morfologia epitelial.....	49
Figura 15. Curva de crescimento das iHEPs.	50
Figura 16: Análise da expressão de genes associados à diferenciação hepática.	51
Figura 17: Caracterização das iHEPs por imunofluorescência..	52
Figura 18: Análise funcional in vitro das iHeps.	53
Figura 19. Análise da capacidade de expressão gênica de enzimas do complexo citocromo P450 nas iHEPs.....	54
Figura 20. Quantificação da atividade da enzima CYP3A4 em resposta às drogas indutoras fenobarbital, rifampicina e dexametasona..	54
Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão das CTM e iHEPs..	55
Figura 22. Citometria de fluxo para análise do conteúdo mitocondrial das iHEPs, CTM e Hepatócitos por marcação com MitoTracker Red FM.	56
Figura 23. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) para purificação das iHEPs pelo conteúdo mitocondrial.....	57
Figura 24. Caracterização morfológica das linhagens iHEP MT High e iHEP MT Low.	58
Figura 25. Caracterização das iHEP MT High e iHEP MT Low por expressão genica.....	58

Figura 26. Relação entre intensidade de GFP e marcação por MitoTracker Red FM.....	59
Figura 27. Identificação de população contaminante.	60
Figura 28. iHEP MT High e iHEP MT Low após protocolos de maturação.....	61
Figura 29. Caracterização por expressão genica das iHEP MT High e iHEP MT Low após protocolo de maturação.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR para isolamento dos genes de interesse...	29
Tabela 2. Primers utilizados nas reações de RT-qPCR.....	35
Tabela 3. Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização das iHEPs.....	36
Tabela 4. Primers utilizados na caracterização funcional das iHEPs.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Alfa anti-tripsina
AFP	Alfa-fetoproteína
Alb	Albumina
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Células-tronco mesenquimais
CT	Célula-tronco
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CK18	Citoqueratina 18
CYP	Citocromo P450
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Epcam	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ESC	Célula-tronco embrionária
FOXA2	<i>Forkhead Box A2</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGF-4	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
GATA 4	<i>GATA Binding Protein</i>
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
HNF4 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4α</i>
HNF3 β	<i>Hepatocyte nuclear factor 3β</i>
HBS	<i>HEPES-buffered solution</i>
HHEX	<i>Hematopoietically-expressed homeobox protein</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i>
ICG	Indocianina verde
iHEP	<i>Induced hepatocyte-like cell</i>
KLF-4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
Sca-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SBF	Soro bovino fetal
SOX2	<i>SRY-Box 2</i>
SOX17	<i>SRY-Box 17</i>
TAE	<i>Tampão Tris-Acetato-EDTA</i>
TAT	<i>Tyrosine aminotransferase</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PPIA	<i>Peptidylprolyl Isomerase A</i>
PROX1	<i>Prospero homeobox 1</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CÉLULAS-TRONCO	15
2.2	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	16
2.3	TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS HEPÁTICAS.....	18
2.4	MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE CTM PARA GERAÇÃO DE HEPATÓCITOS	20
2.5	MATURAÇÃO E EFICÁCIA NOS MÉTODOS DE REPROGRAMAÇÃO HEPÁTICA DIRETA	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	SISTEMA DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE SEGUNDA GERAÇÃO	27
4.2	AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS GENES FOXA2, HNF4A E IRESGFP	27
4.3	CLONAGEM	29
4.4	PRODUÇÃO LENTIVIRAL.....	31
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS CTM.....	32
4.6	TRANSDUÇÃO DAS CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES FOXA2 E HNF4 α	33
4.7.1	<i>Análises de expressão gênica por RT-qPCR</i>	34
4.7.2	<i>Imunofluorescência</i>	35
4.8	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS iHEPs	36
4.8.1	<i>Coloração de Ácido Periódico-Schiff para avaliação da capacidade de estoque de glicogênio</i>	36
4.8.2	<i>Ensaio de captação e liberação de Indocianina verde</i>	36
4.8.3	<i>Coloração de Oil Red O para detecção de deposição de lipídios</i>	37
4.8.4	<i>Ensaio de absorção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL)</i>	37
4.8.5	<i>Ensaio para avaliação da expressão de enzimas do complexo citocromo P450</i>	37
4.8.6	<i>Mensuração da atividade da enzima CYP3A4 por método quimio-luminescente</i>	38
4.9	CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS iHEPS	38
4.9.1	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	38
4.9.2	<i>Análise do conteúdo mitocondrial citoplasmático por citometria de fluxo</i>	39
4.10	MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DAS iHEPs POR CONTEÚDO MITOCONDRIAL CITOPLASMÁTICO	39

4.11	ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO HEPÁTICA DAS iHEPs COM BAIXO E ALTO CONTEÚDO MITOCONDRIAL	40
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
5.1	CLONAGEM	43
5.2	PRODUÇÃO LENTIVIRAL	45
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS CTM.....	46
5.4	TRANSDUÇÃO E SELEÇÃO DAS CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES FOXA2 E HNF4 α	47
5.5	CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MODIFICADA E ACOMPANHAMENTO DA REPROGRAMAÇÃO HEPÁTICA.....	48
5.5.1	<i>Caracterização morfológica, fenotípica e de expressão gênica</i>	48
5.5.2	<i>Caracterização funcional das iHEPs</i>	52
5.6	CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS iHEPs.....	55
5.7	MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DAS iHEPs POR CONTEÚDO MITOCONDRIAL CITOPLASMÁTICO	57
5.8	ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO HEPÁTICA DAS iHEPs	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

As hepatopatias têm alta prevalência na população mundial e estima-se que estas doenças levam à morte mais de 1,7 milhão de pessoas por ano (OMS/WHO, 2008). O tratamento de escolha para os estágios graves das hepatopatias, como a cirrose hepática, é o transplante de fígado. Contudo, essa opção terapêutica apresenta muitas limitações, tais como a falta de doadores compatíveis, o alto custo e a alta taxa de morbidade/mortalidade inerentes ao procedimento (IBARS et al., 2016). Sendo assim, torna-se necessária a busca por terapias alternativas para doenças hepáticas graves.

A terapia celular tem sido extensivamente estudada, tendo como perspectiva sua potencial utilização, no futuro, como alternativa ao transplante hepático. Um exemplo que já alcançou o estágio de testes clínicos é o transplante alogênico de hepatócitos. Entretanto, essa técnica ainda possui muitas limitações para a sua aplicação clínica como, por exemplo, a baixa disponibilidade de órgãos, a dificuldade de isolamento destas células, a possibilidade de rejeição imunológica, a inabilidade dos hepatócitos de proliferarem, impedindo a sua expansão *in vitro*, além da dificuldade de integração funcional das células transplantadas ao tecido hepático (VOGEL et al., 2014; DHAWAN et al., 2010).

Tendo em vista estes fatores limitantes, novas estratégias estão sendo estudadas para permitir a geração de hepatócitos através de fontes extra-hepáticas, facilitando não apenas o uso terapêutico, mas também sua aplicação como ferramentas para estudos *in vitro*, testes de toxicidade, descoberta de novos medicamentos ou estudo do metabolismo celular hepático. Estudos recentes apontam as células-tronco como fontes promissoras para a produção de hepatócitos quando diferenciadas através da ativação de vias de sinalização específicas, em decorrência da exposição a fatores de crescimento ou pequenas moléculas (DONG et al., 2010; GHODSIZADEH et al., 2010; PAUWELYN et al., 2011). A superexpressão de alguns fatores de transcrição, como HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 α*), FOXA2 (*Forkhead Box A protein 2*) e GATA4 (*GATA Binding Protein 4*), também induziu a transdiferenciação de fibroblastos em células semelhantes a hepatócitos, em função e morfologia (HUANG et al., 2011; SEKIYA; SUZUKI, 2011). Contudo, ainda não há um protocolo padrão eficaz para geração de hepatócitos maduros e funcionais, sendo necessários o aperfeiçoamento e estudo de novas técnicas de diferenciação hepática a partir de células-tronco, enfocando principalmente na etapa de maturação (JI et al., 2013).

O presente estudo teve, como objetivo, o desenvolvimento de uma nova estratégia de reprogramação direta de CTM em células semelhantes a hepatócitos, através da modificação genética para superexpressão de dois genes envolvidos no desenvolvimento hepático, os fatores de transcrição FOXA2 e HNF4 α (NAGY et al., 1994). Além da geração e caracterização das células semelhantes a hepatócitos, novos métodos para indução de maturação também serão avaliados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

A busca de novas alternativas terapêuticas para doenças crônico-degenerativas utilizando células-tronco (CT) tem despertado significativo interesse na comunidade científica (THOMSON et al., 1998). As CT são definidas como células indiferenciadas capazes de auto-renovação, seja de forma ilimitada ou por um longo período de tempo, podendo dar origem a células-filhas equivalentes ou a células diferenciadas (WATT; HOGAN, 2000).

As CT podem ser classificadas, de acordo com o seu potencial de diferenciação, em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (WAGERS; WEISSMAN, 2004). As CT totipotentes são capazes de gerar todos os tipos celulares de qualquer folheto embrionário ou extraembrionário (células placentárias). Um exemplo de célula totipotente é o zigoto. As células geradas a partir das primeiras divisões celulares do zigoto permanecem totipotentes e, em seguida, essas células dão origem ao blastocisto, onde já se percebe a presença de duas populações celulares distintas, uma compondo a massa interna e outra a massa externa do blastocisto (MOORE; PERSUAD, 2008).

As CT pluripotentes podem ser isoladas da massa interna do blastocisto, sendo denominadas CT embrionárias, com potencial de diferenciação em células dos três folhetos embrionários (endoderma, ectoderma e mesoderma). Contudo, estas células não são capazes de gerar um indivíduo completo, pois dependem da formação dos tecidos trofoblásticos, gerados pelas células da massa externa do blastocisto. As CT multipotentes, por sua vez, podem produzir um subconjunto de tipos celulares pertencente a um mesmo folheto embrionário. É o caso das células-tronco encontradas no indivíduo adulto, como as células-tronco hematopoiéticas (CTH), responsáveis pela hematopoese e desenvolvimento de todas as células sanguíneas. As células multipotentes estromais ou células-tronco mesenquimais (CTM), também presentes na medula-óssea, são capazes de gerar várias linhagens de origem mesenquimal e são outro exemplo de CT multipotente (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Apesar de muito bem descrita, a classificação das CT baseada no seu potencial de diferenciação é flexível, principalmente no que diz respeito ao enquadramento de tipos

celulares nas categorias de pluripotente e multipotente. Ambos os conceitos se confundem pelo fato de haver relatos de que algumas células classificadas como multipotentes, quando expostas a alguns estímulos específicos, apresentarem aumento da sua plasticidade e se tornando capazes de se transdiferenciar em um grupo mais abrangente de tipos celulares funcionais (VATS et al., 2002). Por conta disso, as CT também podem ser classificadas de acordo com a fase do desenvolvimento, sendo divididas em dois grupos: CT adultas e CT embrionárias.

As CT adultas podem ser encontradas em nichos e tecidos específicos e são importantes na manutenção da integridade e homeostasia de tecidos, tais como a pele, o sangue e os ossos. Constituem esse grupo as CTH, CTM, neurais, dérmicas e de sangue de cordão umbilical. Já as CT embrionárias são oriundas da massa celular interna do blastocisto (THOMSON et al.,1998). Essas células têm sido isoladas de camundongos, primatas e humanos e são capazes de manter a sua pluripotência quando cultivadas *in vitro* na presença de fibroblastos embrionários e de fatores de crescimento, como o *leukaemia inhibitory factor* (LIF). A capacidade das CT embrionárias de se diferenciar em diversos tecidos estimula o estudo das mesmas para futuras aplicações clínicas. Entretanto, algumas limitações, como rejeição imunológica, questões éticas e de segurança envolvendo o risco de formação de teratomas ainda dificultam a utilização desse tipo celular (VATS et al., 2002).

Mais recentemente, a partir do trabalho realizado por Yamanaka e colaboradores (2006), houve o surgimento de mais uma categoria de CT pluripotentes, nomeadas como células-tronco de pluripotência induzida (iPSC). As iPSCs são geradas a partir da superexpressão de alguns fatores de transcrição - classicamente Oct-4, Sox-2, c-Myc e KLF-4 - em fibroblastos adultos ou embrionários, induzindo estas células a se reprogramar a um estado indiferenciado pluripotente.

2.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Dentre os tecidos conhecidos por apresentar células-tronco após o nascimento, a medula óssea foi a mais estudada. Na medula óssea são encontradas as células-tronco hematopoéticas e as CTM (LEMISCHKA, 2005). As CTM foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores, na década de 1970. Eles demonstraram, através de ensaios *in vivo*, que células oriundas da medula óssea de camundongos C57BL/6 se

diferenciaram em osteoblastos cuboides e nódulos mineralizados, se assemelhando a formações ósseas (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY; PETRAKOVA, 1966). Também foi observado que o cultivo de células obtidas do aspirado de medula óssea levava ao surgimento de um grupo de células de aspecto fibroblastóide com capacidade de aderência ao plástico e formação de colônias monoclonais. Esse grupo celular foi nomeado como células precursoras estromais (FRIEDENSTEIN et al., 1974). A caracterização dessas células foi ampliada através das contribuições de outros trabalhos que demonstraram a capacidade de diferenciação das mesmas em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Uma vez confirmada sua multipotencialidade, estas células passaram a ser chamadas de células-tronco mesenquimais (CAPLAN, 1991; HAYNESWORTH et al., 1992).

O isolamento das CTM é geralmente realizado através da sua característica de aderência ao plástico. As mesmas podem ser isoladas de diversos tecidos, como a medula óssea, tecido adiposo, músculo esquelético e placenta (ROMANOV et al., 2005; IGURA et al., 2004; WILLIAMS et al., 1999). No processo de isolamento, algumas células também aderentes, como por exemplo células de linhagem hematopoiética, podem permanecer na cultura, sendo eliminadas com as sucessivas trocas de meio e passagens, levando ao enriquecimento em CTM da cultura (BYDLOWSKI et al., 2009).

Apesar dos métodos de isolamento de CTM serem bem estabelecidos, essa população celular apresenta características fenotípicas heterogêneas no quesito morfológico e de expressão de marcadores de superfície. Por essa razão, o Comitê de Células-Tronco Teciduais e Mesenquimais da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) determinou alguns critérios essenciais para caracterização das CTM humanas, como a capacidade de aderência ao plástico, a expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90 e a não expressão dos marcadores de linhagens hematopoiéticas CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006). A expressão desses antígenos de superfície pode ser alterada de acordo com as condições de cultura, número de passagens e tecido de origem das CTM (BIEBACK et al., 2004). Outra característica importante proposta pelo Comitê da ISCT é a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, quando submetidas a condições de cultura específicas, como densidade celular, meio de cultivo, exposição a fatores de crescimento e citocinas (DOMINICI et al., 2006).

Além das linhagens citadas acima, existem estudos demonstrando a capacidade de diferenciação *in vitro* das CTM em células semelhantes a hepatócitos, cardiomiócitos e neurônios (ZHOU et al., 2016; HERMANN et al., 2016; SONG et al., 2016). No entanto, apesar de serem observadas alterações morfológicas e expressão de alguns marcadores específicos de linhagens, a caracterização funcional normalmente revela células que não apresentam todas as características esperadas.

2.3. TERAPIA CELULAR EM DOENÇAS HEPÁTICAS

Doenças hepáticas agudas e crônicas são consideradas causas importantes de morte, sendo atualmente um grave problema de saúde humana. Estimativas mundiais mostram que 844 milhões de pessoas possuem doenças hepáticas crônicas, com uma taxa de mortalidade de 2 milhões mortes por ano (BYASS, 2014). Dentre as patologias que acometem o fígado, a cirrose hepática tem alta prevalência e é associada a grande parte dos óbitos, sendo responsável por um milhão de mortes, ou o equivalente a 2% do total de óbitos ocorridos no ano de 2010 (ALWAHSH, et al., 2017; MOKDAD, et al., 2014).

Apesar das hepatopatias em estágios avançados de gravidade possuírem uma alta morbidade, apenas um único tratamento eficaz encontra-se disponível: o transplante hepático. Entretanto, essa opção terapêutica apresenta muitas limitações, como por exemplo a falta de doadores compatíveis, o alto custo e a alta taxa de morbidade/mortalidade inerentes ao procedimento (IBARS, et al., 2016).

Neste contexto, a terapia celular tem sido amplamente estudada, com a perspectiva de se tornar uma alternativa promissora ao transplante hepático. Estudos clínicos demonstram que o transplante alogênico de hepatócitos pode ser utilizado como alternativa terapêutica em uma variedade de hepatopatias, incluindo insuficiência hepática aguda e crônica, e doenças metabólicas do fígado (IBARS, et al., 2016).

O princípio da técnica se baseia na hipótese de que os hepatócitos transplantados possam substituir o tecido lesado e promover uma melhora no quadro clínico dos pacientes. Esse procedimento é menos invasivo que o transplante ortotópico hepático e pode ser utilizado como um método paliativo para o processo cirúrgico. Entretanto, essa técnica ainda possui muitas limitações na aplicação clínica, dentre elas a dificuldade de isolamento dessas células, a baixa viabilidade pós-criopreservação e transplante e rejeição

imunológica. Além disso, hepatócitos adultos possuem limitada capacidade de proliferação, o que dificulta não apenas a expansão *in vitro*, mas também a possibilidade de enxertia e de se manterem funcionais no fígado do paciente transplantado (VOGEL, et al., 2014; DHAWAN, et al., 2010).

Estudos recentes indicam que as CTs também podem ser uma promissora fonte de hepatócitos quando diferenciadas através da exposição a determinadas citocinas (DONG et al., 2010), pequenas moléculas ou fatores de crescimento específicos como por exemplo o *Hepatocyte growth factor* (HGF) e o *Fibroblast growth factor* (FGF) (TALÉNS-VISCONTI et al., 2006; SEO et al., 2005). Alguns tipos celulares progenitores, dentre eles, as células progenitoras hepáticas, células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) já foram utilizados como fonte para diferenciação hepática em estudos na área da medicina regenerativa (PAN et al., 2016; MALLANA; DUNCAN, 2013; PAUWELYN et al., 2011). Entretanto, os protocolos utilizados para induzir a diferenciação a partir desses tipos celulares ainda não são capazes de produzir hepatócitos completamente maduros e funcionais em testes *in vitro e in vivo*. Além disso, algumas limitações estão envolvidas no uso dessas células como por exemplo o potencial tumorigênico pós transplante, além de rejeição imunológica no caso das fontes não autólogas (JI; ZHANG; HUI, 2013).

Para contornar essas limitações, linhagens de células adultas autólogas estão sendo estudadas como fonte para reprogramação hepática, como por exemplo as CTM (YU; YUAN; XU, 2014) e os fibroblastos (HUANG et al., 2011; SEKIYA; SUZUKI, 2011). A superexpressão combinada de alguns fatores de transcrição como *Hepatocyte nuclear factor 4a* (HNF4a), *Forkhead Box A protein 1* (FOXA1), *Forkhead Box A protein 2* (FOXA2), *Forkhead Box A protein 3* (FOXA3), *Hepatocyte nuclear fator 6* (HNF6) e *GATA Binding Protein 4* (GATA4), possibilitou a reprogramação de células de origem mesenquimal, como fibroblastos, em células com morfologia epitelial, capazes de absorver glicose e produzir glicogênio, secretar albumina, captar lipoproteína de baixa densidade e metabolizar drogas, características essenciais atribuídas a hepatócitos saudáveis e funcionais. Entretanto, durante o processo de diferenciação celular de fibroblastos, alguns estudos observaram grande quantidade de morte celular acompanhada de senescência e redução da proliferação, sendo necessária a inativação de enzimas reguladoras do ciclo

celular, como o inibidor do ciclo celular p19^{Arf} para a geração de células hepáticas expansíveis. (HUANG et al., 2011; SEKIYA; SUZUKI, 2011).

Por conta disso, muitos estudos estão avaliando o uso das CTM como fonte para reprogramação hepática, visto que estas células são de fácil acessibilidade e isolamento, além de apresentarem baixo potencial de formação tumoral e rejeição imunológica pós-transplante autólogo. Além disso, as CTM apresentam uma alta capacidade de auto-renovação a longo prazo e podem se diferenciar em diversos tipos celulares maduros, características que as classificam como uma promissora fonte para terapias celulares na medicina regenerativa (ENGLISH et al., 2010).

Já foi observado por alguns autores que as CTM, quando expostas a um determinado coquetel de fatores e citocinas que mimetiza o microambiente do desenvolvimento embrionário hepático, se diferenciam em células com características morfológicas epiteliais e graus parciais de funcionalidade hepática, sendo em alguns relatos capazes de produzir de albumina e expressar as enzimas do complexo citocromo P450 (SNYKERS et al., 2007; SCHWARTZ et al., 2002; LEE et al., 2004).

Entretanto, ainda não há um protocolo padrão eficiente para geração de hepatócitos maduros e funcionais de forma equivalente ou superior aos hepatócitos primários, sendo necessário o contínuo aperfeiçoamento e estudo de novas técnicas de diferenciação hepática que visem à praticidade, controle e eficiência do método. Portanto, alguns autores estão investindo na utilização da engenharia genética para modificar ou superexpressar genes nas células alvo com o intuito de aumentar o seu potencial de diferenciação no tecido ou tipo celular de interesse, como por exemplo cardiomiócitos, neurônios e hepatócitos (ZHOU et al., 2016; HERMANN et al., 2016; SONG et al., 2016).

2.4. MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE CTM PARA GERAÇÃO DE HEPATÓCITOS

Estudos explorando a combinação da terapia celular com a terapia gênica estão surgindo em grande número e aprimorando os protocolos de diferenciação celular para produção de linhagens reprogramadas cada vez mais maduras e funcionais.

A terapia gênica consiste na modificação genética de células com o objetivo de utilizá-las no tratamento de doenças. Em geral, essas células são modificadas através da inserção, remoção ou modificação de genes com o intuito de superexpressar ou suprimir a

expressão de determinados produtos com fins terapêuticos. Para isso, alguns tipos de vetores podem ser utilizados no transporte dos elementos genéticos de interesse para o interior da célula-alvo, como por exemplo os vetores virais e não virais. Nos vetores virais, o transgene (gene a ser transferido) substitui regiões gênicas de certos vírus, como por exemplo os adenovírus, retrovírus e lentivírus, estes últimos constituem um subgrupo dos retrovírus. O vírus, ao ser modificado, passa a ser atenuado e incapaz de se replicar ou causar infecção. Já os vetores não-virais encontram-se por exemplo na forma de DNA plasmidial e lipossomas (NARDI et al., 2002).

Apesar dos vetores não-virais possuírem baixa toxicidade e imunogenicidade quando comparados aos vetores virais, a sua eficiência de transdução é baixa, e por isso os vetores virais ainda são os mais utilizados devido principalmente à alta eficiência de transdução. Os sistemas virais trabalham com vírus deficientes em replicação, que são capazes de transferir seu material genético para células-alvo, mas não conseguem replicar-se e causar alguma infecção, o que garante a segurança do método (NARDI et al., 2002).

Um dos vetores virais mais utilizados e eficientes são os lentivírus, que possuem genoma de RNA e são capazes de transduzir células em divisão e pós-mitóticas (SOMIA; VERMA, 2000). Para aumentar o potencial de diferenciação hepática de algumas células, como as iPSCs, fibroblastos e CTM, muitos estudos estão utilizando a superexpressão de alguns fatores de transcrição essenciais no processo da embriogênese hepática, como por exemplo os fatores FOXA2 e HNF4 α , para conferir propriedades hepato-específicas às células-alvo (SEKIYA; SUZUKI, 2011; HUANG et al., 2011).

O FOXA2, também conhecido como HNF3 β (*Hepatocyte nuclear factor 3 β*), é um fator de transcrição expresso durante as fases iniciais do desenvolvimento hepático, estando presente nos estágios de formação do endoderma definitivo e do endoderma hepático específico. Este fator é um dos reguladores da família HNF3, sendo responsável juntamente com o fator FOXA1 pelo estabelecimento do divertículo hepático. No fígado adulto, o FOXA2 é crítico para a manutenção da homeostase de glicose e lipídios. A quantidade de FOXA2 parece diminuir de forma constante em lesões hepáticas de várias etiologias. A eliminação desse fator no fígado no final da gestação leva à diminuição da transcrição de genes que codificam os transportadores de ácidos biliares e enzimas de conjugação, perturbando a homeostase dos ácidos biliares, e gerando estresse do retículo endoplasmático e a lesão hepática (WANG et al., 2017). A partir do mapeamento de

regiões no genoma de ligação compartilhada dos fatores FOXA2 e HNF4 α , foi observado que a via de sinalização Hippo está associada ao controle da rede transcricional do fígado, sendo importante na regulação da expressão desses fatores essenciais no processo de transição de hepatoblastos para hepatócitos diferenciados (GORDILLO et al., 2013).

O HNF4 α começa a ser expresso durante a fase de endoderma hepático específico até a maturação completa dos hepatócitos, mantendo sua expressão durante a vida adulta (MALLANA; DUNCAN, 2013). Este fator tem papel importante no controle da diferenciação das células progenitoras em hepatócitos, sendo essencial na formação do parênquima epitelial hepático e manutenção da arquitetura dos sinusóides, uma vez que a expressão de proteínas de adesão e junção celular é dependente do HNF4 α . A expressão dessas moléculas de adesão nos hepatoblastos em desenvolvimento facilita a formação dos canalículos biliares e converte células imaturas em hepatócitos polarizados, tornando assim este fator um determinante central de função e diferenciação hepática crucial para o estabelecimento da arquitetura do fígado durante o desenvolvimento fetal (ZHAU et al., 2005). A figura 1 ilustra a cadeia de diferenciação celular hepática, fatores de transcrição presentes em cada etapa e moléculas expressas pelas células nesse processo.

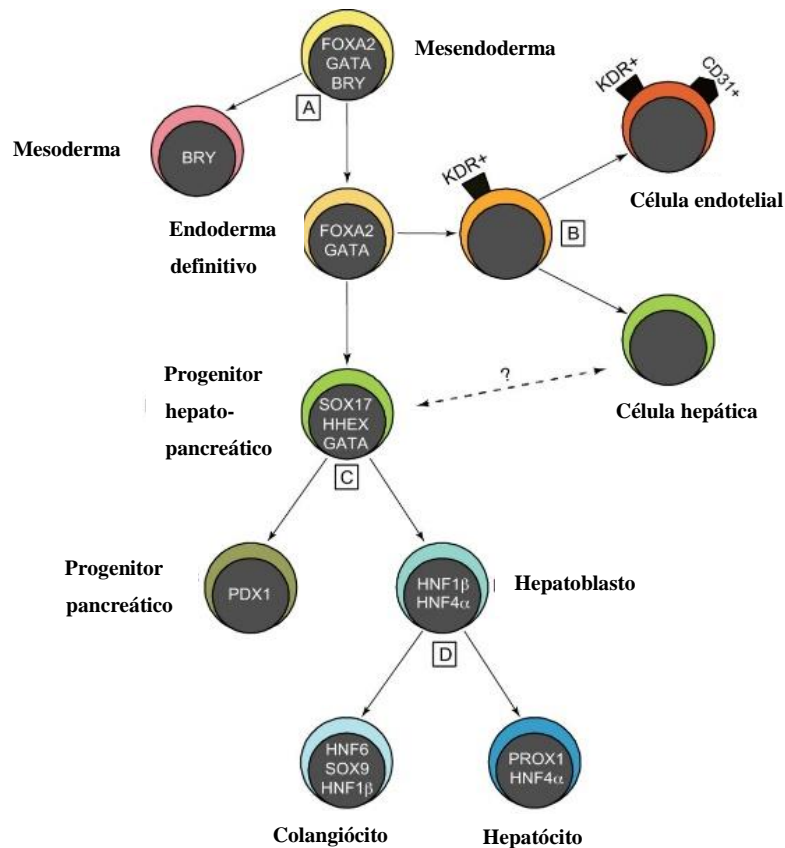


Figura 1: Progenitores bipotentes geram progressivamente células das linhagens hepáticas. São destacados quatro pontos-chave de transição (A-D) durante o desenvolvimento do fígado fetal. (A) As células do mesendoderma segregam em linhagens de mesoderma positivas para Brachyury (BRY) e endoderma definitivo (início de expressão de FOXA2) e GATA4/6). (B) O endoderma definitivo inclui um subconjunto de progenitores positivos para KDR que geram e apoiam o desenvolvimento de células hepáticas; eles também podem dar origem a células endoteliais CD31 (PECAM1) positivas. (C) O endoderma definitivo gera progenitores bipotentes hepato-pancreáticos que expressam SOX17, HHEX e GATA e tem podem se diferenciar em progenitores pancreáticos PDX1 positivos ou hepatoblastos que expressam HNF1β e HNF4α. (D) Hepatoblastos são progenitores para colangiócitos (células de ducto biliar que expressam HNF6, SOX9 e HNF1β) e hepatócitos que expressam PROX1 e HNF4α.

Nessa conjuntura, esse estudo apresentará uma nova estratégia de reprogramação direta de CTM em hepatócitos através do uso da terapia gênica, ou mais especificamente a modificação genética de CTM por vetores lentivirais que serão responsáveis pela superexpressão dos genes envolvidos no desenvolvimento hepático, os fatores de transcrição FOXA2 e HNF4α (NAGY et al., 1994). A superexpressão de ambos os genes, juntamente com estímulos através de cultura em meio específico para hepatócitos serão testados como protocolo eficaz para geração de hepatócitos maduros e funcionais a partir de CTM. Estes fatores já foram

utilizados previamente na literatura em protocolos de reprogramação direta a partir de fibroblastos de camundongos e são considerados essenciais para geração de hepatócitos através desse método de diferenciação celular (SEKIYA; SUZUKI, 2011; HUANG et al., 2011).

A padronização de um protocolo eficaz para geração *in vitro* de hepatócitos maduros e funcionais, a partir de uma fonte autóloga, como as CTM, é de grande importância. Estas células, uma vez diferenciadas e estáveis em cultivo, podem ser utilizadas como ferramentas para estudo de toxicidade aplicada ao desenvolvimento de novos fármacos, assim como seu uso pode ser direcionado a aplicações em medicina regenerativa, uma vez que os hepatócitos transplantados poderiam levar a ganhos de função hepática e melhorar o prognóstico da doença.

2.5 MATURAÇÃO E EFICÁCIA NOS MÉTODOS DE REPROGRAMAÇÃO HEPÁTICA DIRETA

A geração de hepatócitos *in vitro* configura-se um processo complexo independente da fonte celular utilizada ou método de diferenciação. A aquisição de células com perfil de maturação equivalente a hepatócitos primários em cultura é desafiadora, uma vez que este tipo celular tem baixa capacidade proliferativa, dificultando sua identificação e purificação *in vitro* (SANAL, 2015). Já foi demonstrado que células semelhantes a hepatócitos geradas por reprogramação direta a partir de células somáticas têm a capacidade de proliferação e características fenotípicas e funcionais hepáticas como por exemplo expressão e secreção de albumina, atividade de enzimas do complexo citocromo p450, estocagem de glicogênio e potencial de repopulação do fígado em modelos animais de lesão hepática (DU, 2014; HUANG, 2014; LIM, 2016). No entanto, células geradas artificialmente provavelmente exibem características específicas impostas por sistemas de cultura que apenas replicam parcialmente a complexidade do ambiente hepático natural, possuindo ainda um perfil geral de expressão genica, capacidade metabólica e potencial de colonização de fígados lesados em modelos experimentais discrepantes quando comparadas a hepatócitos primários. Isso pode ser atribuído ao estágio de diferenciação em que essas células se encontram, como também ao fato das mesmas serem uma população heterogênea, uma vez que cada célula é originária de um evento único de reprogramação. Isso poderia introduzir um grande grau de variabilidade na cultura e confundir os controles de qualidade atribuídos a capacidade funcional e potencial terapêutico dessas células, que são essenciais para produção de um protocolo de maturação eficiente e adequação dessa metodologia para o uso clínico (VALLIER, 2014).

Protocolos para induzir a maturação e purificação das células semelhantes a hepatócitos no intuito de gerar um produto de terapia celular mais homogêneo e qualificado têm sido extensivamente explorados. Por apresentarem características de progenitores hepáticos, as células geradas por reprogramação direta tendem a ter um potencial de diferenciação bipotente, podendo se diferenciar nas linhagens hepatocitárias ou de ducto biliar (colangiócitos). A determinação da linhagem depende de vias de sinalização, incluindo a via Notch e do TGF β , que promovem a diferenciação biliar. A regulação negativa dessas vias induz a especificação hepática de células progenitoras. Dentre muitos componentes utilizados na busca por métodos de maturação hepática, destacam-se fatores de crescimento e citocinas, tais como o HGF e oncostatina M (citocina da família da interleucina-6), importantes para os estágios iniciais de maturação e desenvolvimento do fígado, assim como pequenas moléculas e químicos relacionados a modificações epigenéticas, tais como os inibidores da histona deacetilase, que induzem um aumento na transcrição de genes de maturação hepática se ligando em regiões promotoras dos genes das enzimas do citocromo P450 e desidrogenase glicose-6-fosfato, antagonistas e agonistas específicos da via de sinalização como dexametasona, molécula ativadora da via de sinalização do receptor de glicocorticóide, importante para a regulação da expressão de genes hepato-específico, e inibidores da via do TGF β , que promove a transição epitelial para mesenquimal e desdiferenciação de hepatócitos (CHEN, 2018).

Contudo, ainda não foi descrito um protocolo definitivo e eficiente para maturação das células semelhantes a hepatócitos, para produção de células com funcionalidade realmente semelhante a hepatócitos primários. Para isso é importante o estabelecimento de uma definição clara do que são células eficientemente reprogramadas, juntamente com uma análise abrangente do epigenoma, RNAs e proteoma das diferentes linhagens (SANAL, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um protocolo para geração de células semelhantes a hepatócitos, do ponto de vista morfológico, fenotípico e funcional, através da reprogramação direta de CTM.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir vetores para expressão dos genes HNF4 α e Foxa2;
- Caracterizar morfológicamente, fenotipicamente e funcionalmente as células semelhantes a hepatócitos geradas a partir da reprogramação direta de CTM;
- Estabelecer protocolo para purificação das células eficientemente reprogramadas;
- Promover a maturação dos hepatócitos gerados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SISTEMA DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O sistema de expressão lentiviral de segunda geração consiste na produção de lentivírus a partir de vetores derivados do genoma do HIV-1. Os vetores utilizados foram adquiridos da Addgene (Cambridge, MA, EUA). O sistema não permite a replicação viral, garantindo assim a segurança do procedimento. Os plasmídeos que compõem o sistema são:

a. Plasmídeos de expressão ou transferência pEGIP (Addgene #26777) ou pFUWOSKM (Addgene #20328), que foram utilizados para inserção dos genes de interesse sob a regulação dos promotores constitutivos EF1 α e UbC, respectivamente. O cassette de expressão dos genes de interesse é flanqueado pelas sequências 5'LTR e 3'LTR, que permitem que o mesmo seja incorporado no genoma da célula hospedeira. Dentro do cassette de expressão do vetor pEGIP, foi inserida a sequência do gene de interesse (FOXA2) acoplado ao gene de resistência ao antibiótico puromicina. Já o cassette de expressão do vetor pFUWOSKM possui a sequência do gene de interesse (HNF4 α) acoplada a do gene repórter IRESGFP. Os plasmídeos de expressão também contêm elementos bacterianos, como o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (*AmpR*), que permite a seleção das bactérias transformadas, e o gene *ori*, que permite a replicação e expansão do vetor de expressão durante o crescimento bacteriano;

b. Plasmídeo empacotador (psPAX2), responsável pela produção das proteínas virais GAG, POL, TAT e REV, necessárias para montagem das partículas lentivirais;

c. Plasmídeo envelope (pMD2.G), que permite a produção glicoproteína G presente no vírus da estomatite vesicular, responsável por conferir alta afinidade por membranas lipídicas.

4.2. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DOS GENES FOXA2, HNF4A E IRES-GFP

As sequências dos fatores de transcrição FOXA2, HNF4 α e IRESGFP foram obtidas através da amplificação por PCR de regiões específicas dos plasmídeos pGCDNsam Foxa2 (Addgene #33004), pGCDNsam HNF4 α (Addgene #33002) e MSCV PIG (Addgene #18751) respectivamente (Figura 2). Estes plasmídeos foram utilizados como molde para a reação de

amplificação dos genes de interesse para futura clonagem nos vetores de expressão lentiviral pEGIP e FUWOSKM, adquiridos da Addgene.

Iniciadores *forward* e *reverse* foram desenhados contendo os sítios de restrição das endonucleases necessárias para o processo de clonagem (Tabela 1), sendo assim, o gene FOXA2 amplificado possui o sítio de restrição referente a enzima BamHI (NEB; R0136S) antes do início da sequência codificante e o sítio de restrição da enzima BsrGI (NEB; R0575S) logo após o término da sequência codificante. Da mesma forma, os produtos da amplificação dos genes HNF4 α e IRESGFP apresentam respectivamente os sítios de restrição para as enzimas XbaI (NEB; R0145S) e BamHI (NEB; R0136S), e, BamHI (NEB; R0136S) e AscI (NEB; R0558S). As mesmas regiões de restrição estão presentes também nos vetores pEGIP (Addgene #26777) e FUWOSKM (Addgene #20328), possibilitando a ligação dos amplicons aos seus respectivos vetores de expressão, quando ambos sofrem a ação das mesmas endonucleases.

A reação de amplificação dos fragmentos foi realizada utilizando os seguintes reagentes: Tampão de Reação para Platinum Taq DNA polimerase 1x (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), MgCl₂ a 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, e 2,0 pmol do iniciador *forward* mmFOXA2_BamHI_F, IRESGFP_BamHI_F ou mmHNF4 α _XbaI_F, e 2,0 pmol do iniciador reverso mmFOXA2_BsrGI_R, IRESGFP_AscI_R ou mmHNF4 α _BamHI_R, para reação de amplificação das sequências de interesse. As condições de ciclagem aplicadas foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Após os 35 ciclos, é realizada uma etapa de extensão final à 72°C por 5 minutos. Os termocicladores utilizados foram Veriti®, ProFlex™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) ou MasterCycler gradient® (Eppendorf, EUA, Hamburgo, Alemanha).

A eficácia da reação de PCR e o peso molecular dos produtos da amplificação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) 1,0% em tampão Ultrapure TAE 1X Buffer (ThermoFisher Scientific), no qual uma alíquota de cada reação, juntamente com um marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Fisher Scientific) se submeteram à 90-100 Volts fornecidos pela fonte de energia PowerPac™ Basic Power supply (Bio-Rad, Hercules, California, EUA) para corrida eletroforética.

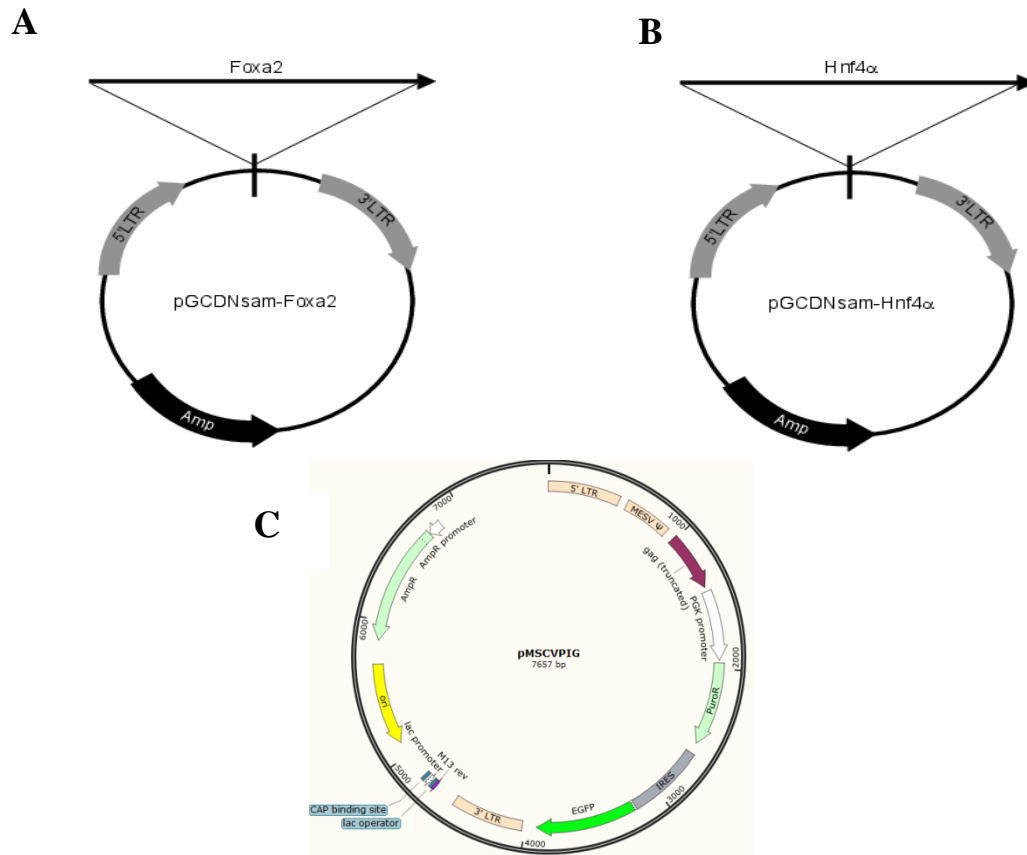


Figura 2. Plasmídeos utilizados como fita molde para isolamento dos genes de interesse FOXA2 (A), HNF4 α (B) e IRESGFP (C).

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR para isolamento dos genes de interesse. Sítio de restrição em negrito.

Primer	Sequência
IRES-GFP_BamHI_F	ACTGGAT CCCC ATGCATCCAATTCGG
IRES-GFP_AscI_R	TTGGCGCG CCTT ACTTGTACAGCTCGTC
mmHnf4a_XbaI_F	CATCTAGAATGCGACTCTCTAAAACCCTTG
mmHnf4a_BamHI_R	TTAGGAT CCCT AGATGGCTTCTTGCT
mmFoxa2_BamHI_F	ATTAGGAT CC ATGCTGGGAGCCGTGAAG
mmFoxa2_BsrGI_R	ACGCCTGTACATTAGGATGAGTTCATAATAGG

4.3. CLONAGEM

Após a purificação dos produtos das reações de amplificação com o NucleoSpin Gel and PCR Clean-up® kit (Macherey-Nagel, Alemanha), as sequências codificantes de interesse juntamente com os vetores de expressão pEGIP e FUWOSKM foram submetidos à digestão

com endonucleases. O fragmento FOXA2 foi digerido com as enzimas BamHI e BsrGI, assim como o plasmídeo pEGIP. Após isso, os produtos das reações foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, e as bandas com maior peso molecular de ambos, cortadas e purificadas. O vetor FUWOSKM e o inserto IRESGFP foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e AscI, os fragmentos de maior peso molecular de ambos foram cortados do gel de agarose 1% e purificados após corrida eletroforética. Após os processos de digestão cada vetor de expressão digerido foi ligado ao seu respectivo inserto utilizando T4 DNA Ligase (1 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific) seguindo o protocolo especificado pelo fabricante. As reações de ligação foram preparadas para um volume final de 20 μ l, contendo 1X T4 DNA ligase reaction buffer e 20 U de T4 DNA ligase. Foram utilizados 50 ng de cada vetor de expressão em uma razão molar inserto:vetor de 3:1 seguindo a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{Massa do vetor (ng)} \times \text{Tamanho do inserto (kb)} \times \text{Razão molar inserto:vetor}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} = \text{massa do inserto (ng)}$$

A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente por duas horas e, em seguida, 2 μ l da mesma foram utilizados na transformação bacteriana de *Escherichia coli* cepa STABLE 3 quimiocompetente por choque-térmico. As bactérias foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100 μ g/mL. As colônias transformadas corretamente apresentaram resistência à ampicilina 100 μ g/mL. Os clones resistentes foram isolados e cultivados *overnight* a 37°C em meio LB líquido com ampicilina a 100 μ g/mL sob agitação de 225 rpm, até atingirem uma OD₆₀₀ entre 1 e 2.

Após o período de incubação, os plasmídeos foram extraídos utilizando PureLink Quick Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Fisher Scientific). Uma vez purificados, os mesmos foram submetidos a uma digestão confirmatória com as enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem e foram escolhidos clones positivos de cada construção para sequenciamento no ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) para análise de possíveis mutações. O gene HNF4 α foi inserido posteriormente no vetor pFUWOSKM após o mesmo ser clonado com o gene repórter IRESGFP. Para isso, o vetor pFUWOSKM-IRESGFP e o inserto HNF4 α foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XbaI, submetidos a corrida eletroforética e as bandas de maior peso molecular foram purificadas e em seguida

ligados seguindo o mesmo protocolo utilizado nas clonagens anteriores. O produto da ligação foi utilizado na transformação de *E. coli* STABLE 3 quimiocompetentes. Após seleção e purificação dos clones resistentes à ampicilina as construções foram submetidas à digestão confirmatória e sequenciamento. Os clones positivos de ambos os plasmídeos produzidos foram utilizados na produção lentiviral.

4.4. PRODUÇÃO LENTIVIRAL

A linhagem empacotadora HEK293FT foi utilizada para geração de lentivirus baseados em HIV-1, incompetentes para replicação, e capazes de entregar e expressar os genes de interesse nas células-alvo. As células HEK 293 FT foram plaqueadas em placas de cultura de poliestireno 96x21 MM (2×10^6 células/placa) e cultivadas em 10 ml de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) completado com 10% de soro bovino fetal (SFB; Thermo Fisher Scientific), 24 horas antes da transfecção. Cerca de duas horas antes da transfecção transiente, o meio das células foi trocado. Em seguida, a solução de transfecção foi preparada em tubo falcon 15 ml, no qual foram adicionados, 20 µg do vetor de expressão contendo o gene FOXA2 ou HNF4 α , 15 µg do vetor pSPAX2 e 7 µg do vetor pMD2.G, que foram misturados com a adição de cloreto de cálcio 2,5 M para uma concentração final de 125 mM e precipitados com o gotejamento de 500 µl de tampão 2x HBS pH 7,11 sob agitação. As soluções contendo os precipitados de DNA, foram dispensadas por gotejamento sobre o meio de cultura das células plaqueadas. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas e, após esse período, o meio foi trocado. A partir de 48 horas de cultura, o meio das células foi coletado diariamente, nos dois dias subsequentes, sendo armazenado em tubo falcon 50 ml, a 4°C, até o momento da concentração das partículas virais. Com o objetivo de descartar qualquer resquício de célula, o sobrenadante coletado foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, e em seguida filtrado em filtro de com poro 0,45 µm e de baixa ligação proteica (Merck, Darmstadt, Alemanha). A ultracentrifugação para concentração das partículas virais foi realizada a 25.000 rpm por 2 horas, a 4°C utilizando a ultracentrífuga OptimaXE com o rotor SW 32 Ti (Beckman Coulter, Brea, California, EUA). Ao finalizar este procedimento, o sobrenadante é descartado e o precipitado viral ressuspensionado em 200 µl de PBS, mantido a 4°C por 16 horas, para aumentar a eficiência da ressuspensão e, em seguida, aliquotado e estocado à temperatura de -80°C.

4.5. CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

As CTM previamente isoladas de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram mantidas em cultura no meio DMEM (GIBCO) suplementado com 10% SBF e 1% Penicilina/Estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e incubadas em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂, o meio foi trocado a cada 2 dias.

As CTM foram caracterizadas por imunofenotipagem para confirmação do fenótipo mesenquimal. Para isso, após tripsinização e duas lavagens com PBS, seguidas de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, o *pellet* foi ressuspendido em PBS e 10⁶ células foram incubadas por 30 minutos a 4°C na presença dos anticorpos CD90APC (BD Biosciences), CD44PE (BD Biosciences), CD29PE (e-Bioscience, San Diego), Sca-1FITC (BD Biosciences), CD11bPE-Cy5.5 (e-Bioscience, San Diego), CD34APC (BD Biosciences) e CD45APC-Cy7 (BD Biosciences). Em seguida foram realizadas duas lavagens com PBS e, por técnica de citometria de fluxo, foram adquiridos e analisados 50.000 eventos no equipamento LRSFortessa (BD).

As CTM também foram caracterizadas pela avaliação da sua multipotência, para isso foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas 13 mm em meio completo (10⁴ células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro Adipogenesis Differentiation Kit ou meio de diferenciação osteogênica StemPro Osteogenesis DifferentiationKit ou meio de diferenciação condrogênica StemPro Chondrogenesis DifferentiationKit (Thermo Fisher Scientific). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias, e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS, Shinjuku, Tóquio, Japão).

Durante o processo de diferenciação foram mantidos, como controle, células cultivadas em meio de crescimento completo (DMEM). Para observar a deposição de gordura, após 15 dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. A seguir, foram coradas com solução de Oil red por 5 minutos e lavadas com álcool 70%. A deposição de cálcio foi observada através da coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram

coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos e, em seguida, foram feitas duas lavagens com água destilada. Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de Alcian Blue (Thermo Fisher Scientific) em HCl 0,1 N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com solução de HCl 0,1 N e, em seguida, foi adicionada água destilada para neutralização da acidez.

As imagens das células diferenciadas em condrócitos, adipócitos, osteócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (Olympus), utilizando o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics, EUA).

4.6. TRANSDUÇÃO DAS CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES FOXA2 E HNF4A

Após serem caracterizadas, as CTM foram cultivadas em placas de seis poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço) no meio DMEM (ThermoFisher Scientific) e após 24 horas transduzidas com 10 μ l de ambos os lentivírus carreando os genes de interesse na presença do lipídeo policatiônico polibrene (SIGMA) (6 μ g/mL), utilizado para melhorar a eficiência da transdução uma vez que aumenta a afinidade da membrana plasmática pelo vírus. O meio foi trocado após 24 horas para retirada das partículas lentivirais remanescentes e no quarto dia de cultura as células transduzidas com ambos os vetores foram selecionadas pelo tratamento com o antibiótico puomicina (ThermoFisher Scientific) na concentração de 2 μ g/mL.

Após a seleção dos clones CTM_FOXA2_HNF4 α resistentes à puomicina, o antibiótico foi retirado do meio de cultura DMEM e o mesmo foi trocado por meio de indução da diferenciação hepática e geração das células semelhantes a hepatócitos (iHEPs), composto por: DMEM/F12 (ThermoFisher; 10565042) suplementado com HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) na concentração de 20 ng/mL, FGF4 (*Fibroblast Growth Factor 4*) na concentração de 10 ng/mL, EGF (*Epidermal Growth Factor*) na concentração de 20 ng/mL, nicotinamida a 10 μ M, dexametasona a 0,1 μ M e com o inibidor da via do TGF β SB 431542 a 1 μ M, conforme representado no esquema da Figura 3.

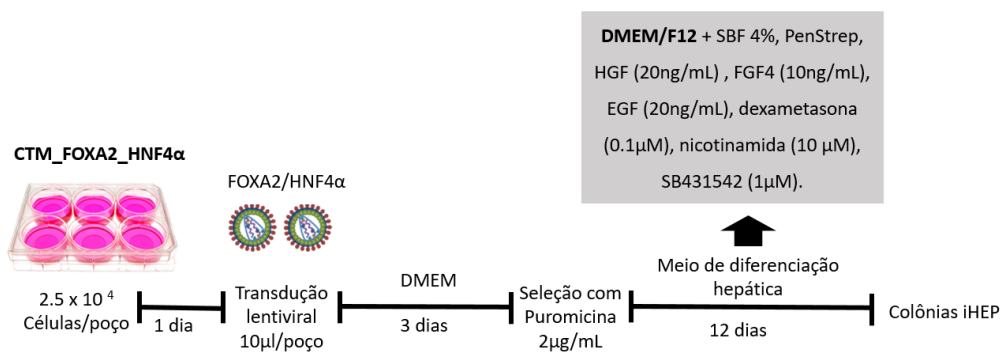


Figura 3: Representação esquemática do protocolo utilizado para geração das iHEPs através de reprogramação direta de CTM.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS iHEPs POR MARCADORES HEPÁTICOS

4.7.1. Análises de expressão gênica por RT-qPCR

O RNA total de 1×10^6 células submetidas ao protocolo de reprogramação e de CTM não transduzidas foi extraído utilizando o método do Trizol® (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e, em seguida, as amostras foram estocadas a -80°C . A reação de transcrição reversa foi realizada posteriormente utilizando um kit comercial, conforme recomendações do fabricante (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; ThermoFisher Scientific). As condições de ciclagem utilizadas foram: 10 minutos a 25°C , seguidos de 120 minutos a 37°C . O cDNA produzido foi estocado a -20°C até as reações de RT-qPCR.

As amplificações foram realizadas em triplicata utilizando o gene endógeno normalizador *EEF2* (*Eukaryotic elongation factor 2*). As sequências referentes aos *primers* utilizados para análise da expressão gênica estão descritas na tabela 2. As reações foram preparadas com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) sob às seguintes condições de ciclagem: 95°C – 5 minutos, 40 ciclos de 95°C – 15 segundos e 60°C - 1 minuto. Em seguida, foi adicionada a etapa de desnaturação (*melting*): 95°C - 15 segundos, 60°C - 1 minuto, 95°C - 30 segundos, 95° - 15 segundos. O equipamento utilizado foi ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de RT-qPCR.

Primer	Sequência
mmAlbumina-F	TCGCTACACCCAGAAACCAC
mmAlbumina-R	CAGCAGACAACGCAG
mmAFP-F	ACTAGCGATGTGTTGGCTGC
mmAFP-R	ATGTGCTTTGCAACTCTCGG
mmEEF2 -F	TGAGATCAAGGACAGTGTGGTG
mmEEF2-R	TCATGAACATCAAACCGCACAC
mmTAT-F	TGTGAACAGCACTACCACTG
mmTAT-R	GTCCTTGCGTGGGACATGTC
mmAAT-F	CCTGCTAAACAGGCGCAGAA
mmAAT-R	TCGATGGTCAGCACAGCCTTA
mmCK18-F	GATCGTGGATGGCAGAGTGG
mmCK18-R	TTCCCTCCTTCTCTGCCTCAGT

4.7.2. Imunofluorescência

As iHEPs foram cultivadas em placa de 24 poços, contendo lamínulas de 13 mm. No dia 17 da diferenciação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Em seguida foi feita a lavagem dos poços por duas vezes com PBS 1x durante cinco minutos e realizada a permeabilização com Triton X-100 0.1% por 10 minutos, nos poços destinados a marcações de antígenos nucleares. Após a lavagem com PBS 1X por cinco minutos, realizou-se o bloqueio com Background blocker (Dako, EUA) por 10 minutos, seguido de incubação a 4° C *overnight* com os anticorpos primários (Tabela 3). Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante cinco minutos, seguida de duas lavagens com PBS 1X por cinco minutos. Subsequentemente, foi realizada a incubação em temperatura ambiente durante uma hora com o anticorpo secundário (Tabela 1). Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante cinco minutos e mais duas lavagens com PBS também por cinco minutos. As lamínulas foram montadas com meio de montagem VectaShield contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para coloração nuclear e analisadas utilizando microscópio confocal A1+ (Nikon, Minato, Tóquio, Japão).

Tabela 3: Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização da linhagem iHEP.

Anticorpo	Espécie	Diluição	Fabricante	Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Albumina	Coelho	1:500	DAKO	Anti-coelho A568	1:1000	Molecular Probes
FOXA2	Cabra	1:100	Santa Cruz	Anti-cabra 488	1:500	Molecular Probes
CK18	Coelho	1:100	Santa Cruz	Anti-coelho A568	1:1000	Molecular Probes
E-caderina	Camundongo	1:100	BD	Anti-camundongo 488	1:500	Molecular Probes

4.8 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS iHEPs

4.8.1 Coloração de ácido periódico-Schiff para avaliação da capacidade de estoque de glicogênio

Foi utilizada placa de 24 poços para cultivo das iHEPs (10^5 células/poço) até atingirem confluência de 90%. Após isso as células foram fixadas numa solução 1:1 de acetona/metanol a -20°C por 20 minutos e lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida as mesmas foram incubadas em solução de ácido periódico 1% por 10 minutos a temperatura ambiente. Após duas lavagens com água destilada foi adicionado o reagente de Schiff e as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi utilizada água destilada aquecida a 40°C para lavagem do reagente após o período de incubação e, em seguida, as células foram observadas em microscópio de campo claro. Foram utilizadas como controle CTM.

4.8.2 Ensaio de captação e liberação de indocianina verde

As iHEPs foram cultivadas em placa de 24 poços (10^5 células/poço) até atingirem confluência de 90%. Foi adicionado ao meio de cultura a solução de indocianina verde (ICG) na concentração final de 1 mg/ml e, em seguida, as células foram incubadas por uma hora em incubadora a 37°C e 5% CO_2 , lavadas três vezes com PBS 1X e a captação de ICG foi observada em microscópio de campo claro. Em seguida, as células foram expostas a um meio de cultura

sem ICG para induzir a liberação do mesmo após quatro horas de incubação. Foram utilizadas como controle CTM.

4.8.3 Coloração de Oil Red O para detecção de deposição de lipídios

As iHEPs foram cultivadas em placa de 24 poços (10^5 células/poço) até atingirem confluência de 90% e fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em etanol a 70% por três minutos. A seguir, foram coradas com solução de Oil red (SIGMA) por cinco minutos e lavadas com etanol a 70%. A deposição de gordura foi observada em microscópio de campo claro. Foram utilizadas como controle CTM.

4.8.4 Ensaio de absorção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL)

Em placa de 24 poços iHEPs cultivadas numa confluência de 80% foram incubadas com $10\mu\text{g/ml}$ de LDL acetilada marcada com 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindo-carbocanina perclorato, DiI (DiI- Ac-LDL) (Biomedical Technologies, Mt Arlington, Nova Jersey EUA) por quatro horas a 37°C . Em seguida a fluorescência das moléculas de LDL foi observada juntamente com a marcação nuclear de DAPI. Foram utilizadas como controle CTM.

4.8.5 Ensaio para avaliação da expressão de enzimas do complexo citocromo P450

Para avaliar a capacidade de metabolização de drogas pelos níveis de expressão das enzimas do citocromo P450, iHEPs e CTM foram cultivadas em meio suplementado com dexametasona ($100\mu\text{M}$), rifampicina ($30\mu\text{M}$), omeprazol ($50\mu\text{M}$) ou fenobarbital (1mM) por 48 horas a 37°C . Em seguida, a expressão dos genes codificantes para as enzimas CYP3A11, CYP3A44 e CYP1A1 foi observada por RT-qPCR utilizando os *primers* descritos na tabela 4.

Tabela 4: Primers utilizados na caracterização funcional das iHEPs para análise da expressão gênica das enzimas do citocromo P450.

mmCYP3A44-F	TGGACCCAGGAACTGCATTG
mmCYP3A44-R	GCATCCCGTGGCACAACCTT
mmCYP3A11-F	TTCCAGCCTTGTAAGGAAACACA
mmCYP3A11-R	TGTACTGAATCTTTAACCAGGCATCA
mmCYP1A1 -F	CCTTCCGGCATTCATCCTTC
mmCYP1A1-R	TTTCAGGCCGGAACCTCGTTT

mmBeta actina -F	TCCCTTGGATCTTTGCAGTT
mmBeta actina-R	CCCACAGCACTGTAGGGTTT

4.8.6 Mensuração da atividade da enzima CYP3A4 por método quimioluminescente

Para avaliação da atividade da enzima CYP3A4 foi utilizado o kit P450-Glo CYP3A4 assay system (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com o protocolo adaptado disponibilizado pelo fabricante. As iHEPs foram previamente incubadas por 48 horas em meio suplementado com fenobarbital (1 mM), dexametasona (100 μ M) ou rifampicina (30 μ M). Em seguida o meio de cultura foi trocado e adicionado meio contendo o substrato luminogênico da enzima CYP3A4 por uma hora a 37°C. Após incubação, 50 μ l do sobrenadante da cultura foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 ml e mais 50 μ l do reagente de detecção da luciferina foi adicionado ao mesmo tubo. A reação foi incubada à temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos e em seguida foi feita a leitura da luminescência no leitor GLOMAX 20/20 Luminometer (Promega). Os dados de luminescência foram normalizados pela respectiva concentração de proteína total por cada poço.

4.9 CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS iHEPS

4.9.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As iHEPs e CTMs foram cultivadas em placas de 24 poços aderidas em lamínulas de material plástico revestidas com Matrigel (Corning, Nova Iorque, EUA) adequadas para cortes ultrafinos até atingirem confluência de 90%. Após isso as células foram fixadas por uma hora em temperatura ambiente com formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação, o material foi lavado três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2), pós-fixados com uma solução de tetróxido de ósmio (Sigma) 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio. Subsequentemente, o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90, e 100%) e incluído em resina Polybed (Polysciences, Washington, PA, EUA). Cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo Leica UC7 32 (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Alemanha) e coletados em grades de cobre com 300 malhas, contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo e foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1230) a 15 kV.

4.9.2 Análise do conteúdo mitocondrial citoplasmático por citometria de fluxo

O conteúdo mitocondrial citoplasmático foi avaliado através da marcação com MitoTracker Red FM (ThermoFisher Scientific) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As iHEPs foram cultivadas em placa de 6 poços até atingirem confluência de 90%, em seguida 1×10^6 células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e incubadas com MitoTracker Red FM por 30 minutos a 37°C (500 nM). Após isso as células foram lavadas e marcação analisada por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD LSRFortessa (BD Biosciences). A intensidade de marcação relativa ao montante mitocondrial citoplasmático foi comparada às CTM e aos hepatócitos primários.

4.10 MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DAS iHEPs POR CONTEÚDO MITOCONDRIAL CITOPLASMÁTICO

Foram utilizadas 1×10^7 iHEPs cultivadas por mais de 25 passagens com o meio de indução da reprogramação hepática descrito previamente. Seguindo as recomendações do fabricante, as células foram incubadas com o marcador MitoTracker Red FM (ThermoFisher,Scientific) por 30 minutos a 37 °C (500 nM) para marcação de mitocôndrias em células viáveis e posteriormente lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS 2% SBF. Em seguida, a marcação foi analisada por citometria de fluxo e as populações com mais baixa e mais alta intensidade de fluorescência (iHEP MT *high* e iHEP MT *low*) foram separadas por *cell sorting* utilizando o equipamento BD FACS Aria II (BD Biosciences). As células foram separadas à uma taxa de classificação baixa utilizando uma pressão de 45 lbf/in² (3.1 bar). As mesmas foram adquiridas utilizando os parâmetros *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) para excluir *debris* celulares e agregados. A coloração de DAPI foi utilizada para marcar células não viáveis. Estas células foram excluídas antes da análise. Após a separação, ambas as populações foram mantidas em cultura no meio de indução da reprogramação hepática.

Em seguida, o RNA de ambas as culturas foi extraído com o RNeasy Mini RNA Extraction kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante. Após quantificação utilizando o sistema NanoDrop foi realizada a reação de transcrição reversa utilizando o kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), conforme recomendações do fabricante, e o cDNA produzido foi utilizado para análise de expressão

gênica por qRT-PCR no equipamento LightCycler 480 II (Roche). Foram utilizados os iniciadores comerciais da Qiagen QuantiTect: Albumina (Qiagen, QT00115570), Alfafetoproteína (AFP) (Qiagen, QT00174020), Epcam (Qiagen, QT02304456), Sca-1 (Qiagen, QT00293167), KRT19 (Qiagen, QT00156667), HNF4a (Qiagen, QT00144739), PPIA (Qiagen, QT00247709). A expressão gênica foi normalizada utilizando o gene endógeno *PPIA* e as amostras foram amplificadas em triplicata.

Após duas semanas de cultura em meio de diferenciação, as iHEP MT *High* e iHEP MT *Low* foram cultivadas em placa de 12 poços (1×10^5 células/poço) e preparadas para marcação por imunofluorescência seguindo o protocolo previamente descrito. Foi utilizado como anticorpo primário Anti-alfa actina de músculo liso (Anti-Asma) (Abcam, São Francisco, EUA), produzido em camundongo, na concentração de 1:1000. Como anticorpo secundário foi utilizado Anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) na diluição de 1:500. Foram adquiridas imagens de 4 campos diferentes no microscópio Eclipse Ti2-U (Nikon) e o percentual de células com marcação positiva para α -SMA foi quantificado em cada campo gerando uma média final. A quantificação foi feita utilizando o programa de análise Image J.

Os procedimentos descritos nesse tópico foram realizados em colaboração internacional no Center for Regenerative Medicine – Universidade de Edimburgo – Escócia.

4.11 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO HEPÁTICA DAS iHEPs COM BAIXO E ALTO CONTEÚDO MITOCONDRIAL

As iHEPs MT *high* e *low* foram cultivadas separadamente em placa de 6 poços (3×10^4 células por poço) no meio de diferenciação hepática por 24 horas. Em seguida o meio foi trocado e acrescentadas as moléculas ácido valproico (0,5 mM), parnato (tranilcipromina) (5 μ M) e TTNPB (1 μ M) ou DMEM F12 (ThermoFisher Scientific) suplementado com 10 % SBF, 1% penicilina/estreptomicina, dexametasona (10 μ M), SB431542 (10 μ M), oncostatina M 20 (ng/ml), ácido valproico (0,5 mM), tranilcipromina (5 μ M) e TTNPB (1 μ M). Células cultivadas somente em meio de diferenciação foram utilizadas como controle. O meio foi trocado a cada dois dias por uma semana. Após esse período foram observadas modificações morfológicas por microscopia de luz e para análise de expressão gênica o RNA de cada amostra foi extraído com

RNeasy Mini RNA Extraction kit (Qiagen) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante. Após quantificação utilizando o sistema NanoDrop foi realizada a reação de transcrição reversa utilizando o kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), conforme recomendações do fabricante, e o cDNA produzido foi utilizado para análise de expressão gênica por qRT-PCR no equipamento LightCycler 480 II (Roche, Basileia, Suíça). Foram utilizados os iniciadores comerciais da Qiagen QuantiTect: Albumina (Qiagen, QT00115570), alfafetoproteína (AFP) (Qiagen, QT00174020), aquaporina 1 (AQP-1) (Qiagen, QT00109242), PPIA (Qiagen, QT00247709). A expressão gênica foi normalizada utilizando o gene endógeno *PPIA* e as amostras foram amplificadas em triplicata.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação entre os resultados numéricos dos diferentes grupos foi realizada utilizando testes estatísticos apropriados para dados paramétricos ou não paramétricos, definidos a partir de testes de normalidade. Dados paramétricos foram analisados utilizando o teste *t* de Student (para comparação entre dois grupos) ou One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações, entre três ou mais grupos. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.7 CONSTRUÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS

5.7.1 Amplificação das seqüências codificantes dos genes *FOXA2*, *HNF4 α* e *IRESGFP*

Após as reações de amplificação e eletroforese em gel de agarose 1%, foi possível observar as bandas com o tamanho correto referentes a cada gene amplificado (Figura 4). Foi realizada a incorporação dos sítios de restrição para endonucleases nas seqüências codificantes dos genes de interesse e purificação dos amplicons em quantidade suficiente para dar continuidade ao processo de clonagem.

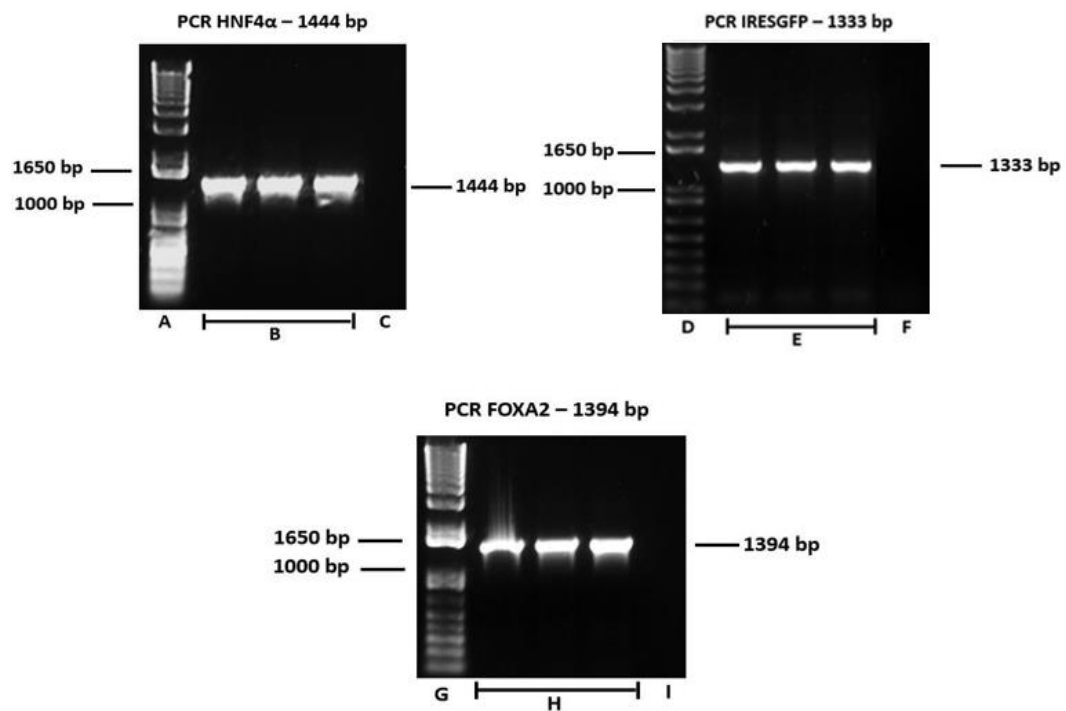


Figura 4. Amplificação dos transgenes. Gel de agarose a 1% representando a amplificação dos genes *HNF4 α* (1444 bp), *IRESGFP* (1333 bp) e *FOXA2* (1392 bp). Marcador de peso molecular (A, D, G), Triplicata da reação de PCR (B, E, H) e branco (C, F, I)

5.7.2 Clonagem

Após a digestão dos amplicons e seus respectivos plasmídeos com as endonucleases, foi realizada a etapa de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase. As novas construções recombinantes contendo os transgenes FOXA2 e HNF4 α IRESGFP foram nomeadas respectivamente como pFOXA2IP e pFHIG (Figura 5). Bactérias quimiocompetentes da cepa STABLE3 foram transformadas, com sucesso, com os plasmídeos recombinantes, uma vez que foram observadas colônias resistentes à ampicilina.

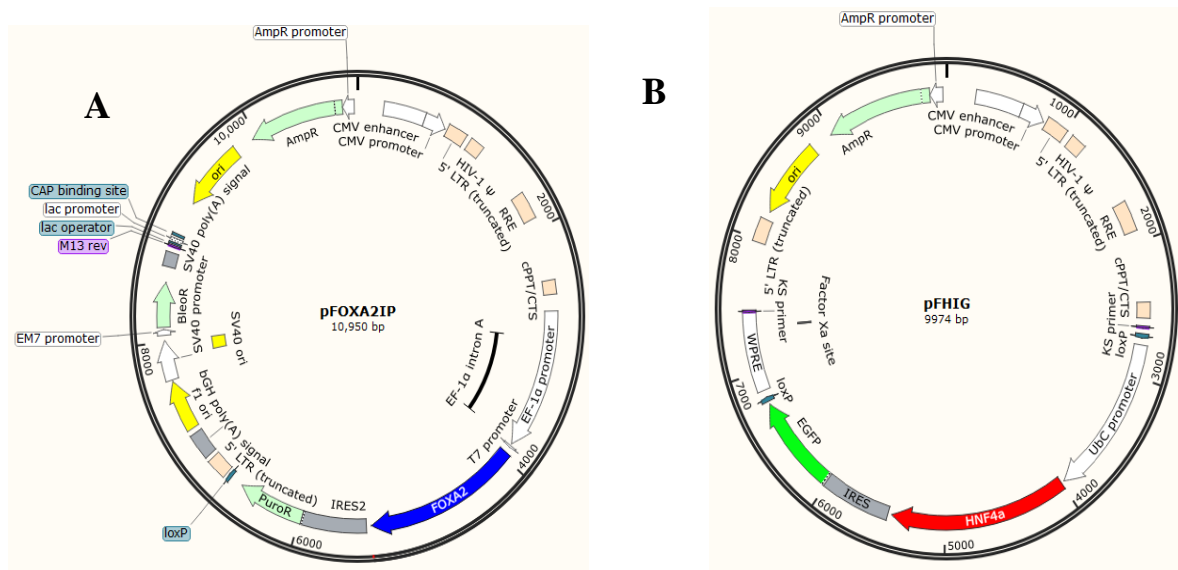


Figura 5. Construção dos vetores lentivirais para superexpressão dos genes FOXA2 (A) e HNF4 α (B).

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos dos clones resistentes à ampicilina e, em seguida, para confirmação da presença dos transgenes, os vetores foram digeridos com as mesmas endonucleases utilizadas no processo de clonagem. A eficácia da clonagem foi confirmada em gel de agarose pela presença de fragmentos de pesos moleculares específicos, de acordo com os tamanhos referentes aos insertos (Figuras 6 e 7). Quando submetidas à reação de sequenciamento, não foram identificadas mutações nas construções, quando comparadas às sequências de referência.

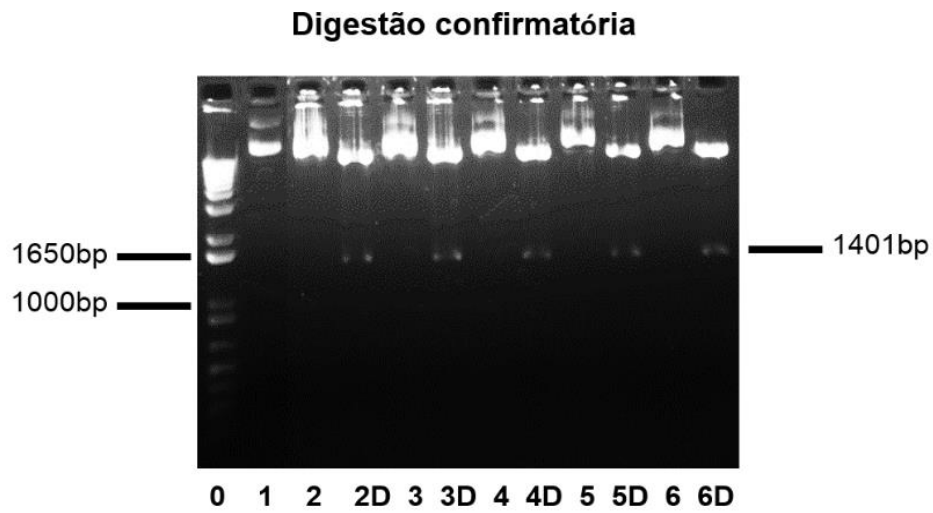


Figura 6. Digestão confirmatória do vetor pFOXA2 em gel de agarose 1%. Reação realizada com as enzimas de restrição BamHI (NEB, R0136L) e BsrGI (NEB, R0575L) após clonagem. Marcador de peso molecular (0), pEGIP não digerido (1), clones não digeridos (2,3,4,5,6), clones digeridos (2D,3D,4D,5D,6D).

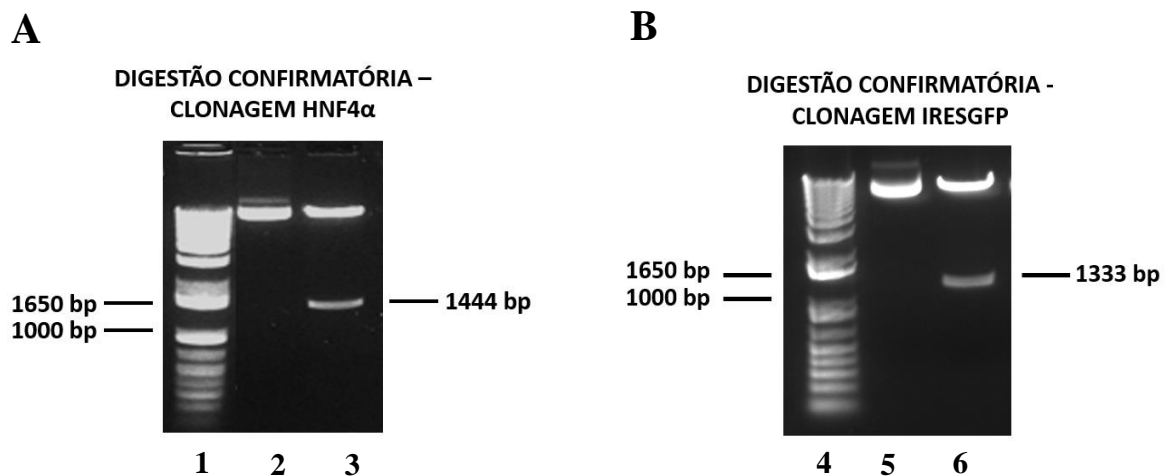


Figura 7. Digestão confirmatória do vetor pFHIG em gel de agarose 1%. Reação realizada com as enzimas BamHI e BsrGI (3) e BamHI e AscI (6) após clonagem revelando liberação de fragmentos referentes aos genes HNF4 α (A) e IRESGFP (B). Marcador de peso molecular (1 e 4).

5.8 PRODUÇÃO LENTIVIRAL

A eficiência da transfecção de células HEK293FT com os vetores foi estimada através da utilização, como controle, de vetores contendo o gene repórter para expressão de GFP. O vetor pEGIP foi usado como controle da transfecção, sendo a eficácia do processo extrapolada para a transfecção com o vetor pFOXA2IP, pois este não possui genes repórteres. A fluorescência GFP presente nas HEK293 transfectadas confirmou a expressão do vetor pEGIP nas células e consequentemente a eficácia do método (Figura 8). O mesmo foi observado na transfecção com a construção pFHIG (Figura 9).

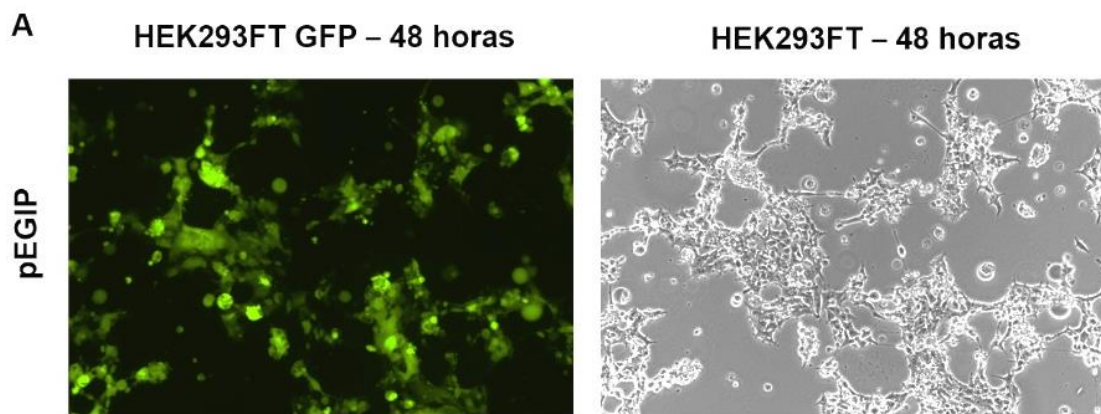


Figura 8. Transfecção com o vetor pEGIP. Células HEK 293FT expressando fluorescência GFP, 48 horas após a transfecção com o plasmídeo controle pEGIP (A). Magnificação: 100x.

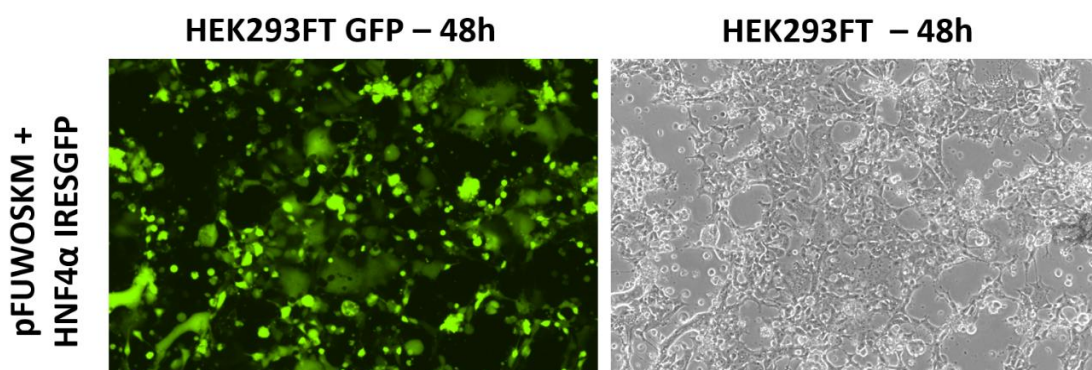


Figura 9. Transfecção com o vetor pFHIG. Células HEK 293FT expressando fluorescência GFP, 48 horas após a transfecção com o plasmídeo pFUWOSKM clonado com os genes HNF4 α e IRESGFP (pFHIG). Magnificação: 100x.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

As CTMs em cultivo apresentavam aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, características desse tipo celular (Figura 10). A análise fenotípica por citometria de fluxo revelou que as CTM foram positivas para expressão de marcadores mesenquimais (CD90, CD44, CD73, CD29 e Sca-1) e negativas para marcadores hematopoiéticos (CD19, CD34 e CD117) (Figura 11). As células também foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos quando cultivadas em meios indutores de diferenciação, que é uma das características típicas de CTMs (Figura 12).

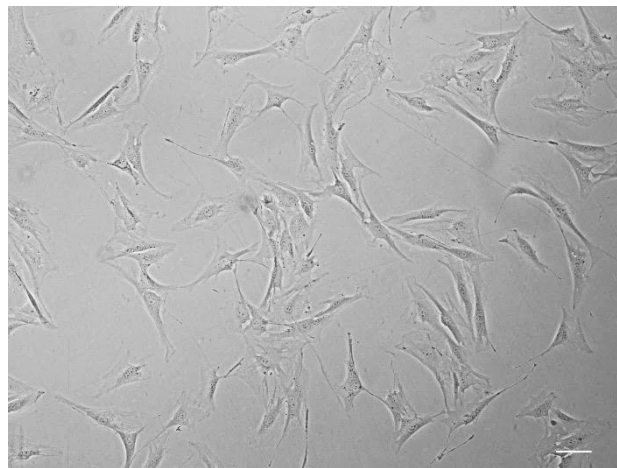


Figura 10. Aspecto morfológico das CTM da medula óssea de camundongos. Imagem de contraste de fase obtida da cultura de CTM. Barra: 50 μ m

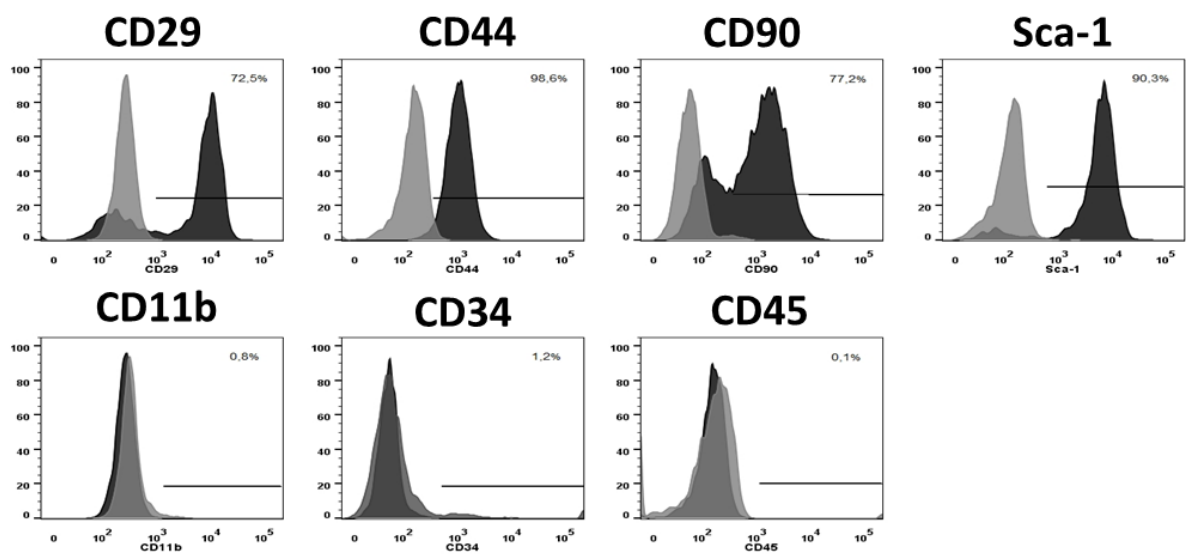


Figura 11. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das CTM isoladas da medula-óssea de camundongos. Histogramas demonstrando a expressão de marcadores típico de células mesenquimais e negatividade para marcadores típicos de células de origem hematopoiética.

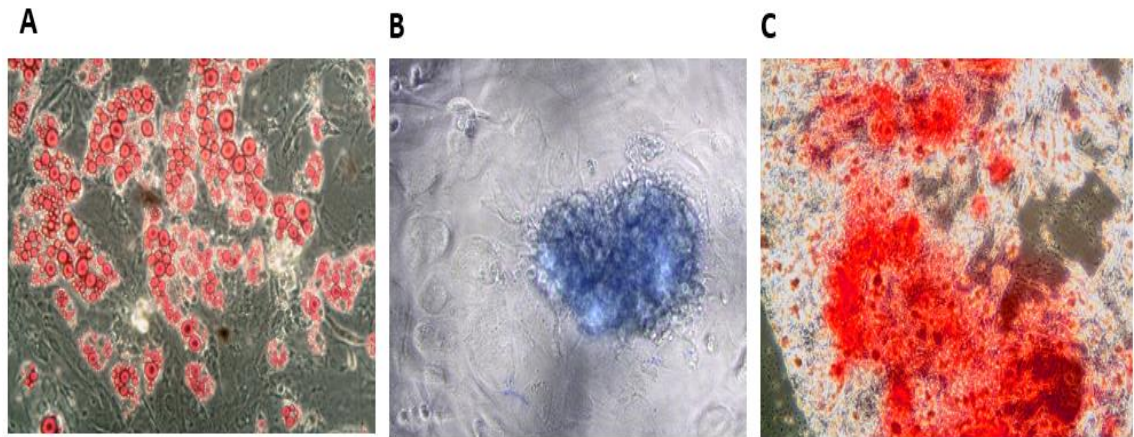


Figura 12. Avaliação de multipotência em CTM. Caracterização das CTMs por indução de diferenciação adipogênica demonstrada por coloração de Oil red (A), condrogênica demonstrada por coloração de Alcian Blue (B) e osteogênica demonstrada por coloração de Vermelho de Alizarina (C). Magnificação 100X.

5.10 TRANSDUÇÃO E SELEÇÃO DAS CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES FOXA2 E HNF4 α

As CTMs transduzidas com ambos os lentivírus apresentaram resistência ao antibiótico puromicina a 2 μ g/ml, conferida pela presença do transgene FOXA2 *in frame* com o gene de resistência à puromicina em seu genoma, após 72 horas de cultura. A expressão do transgene FOXA2 nas CTMs é regulada pelo promotor constitutivo EF1 α , sendo assim as CTMs não infectadas foram susceptíveis ao tratamento com puromicina, o que permitiu a adequada seleção dos clones resistentes eficientemente transduzidos (Figura 13).

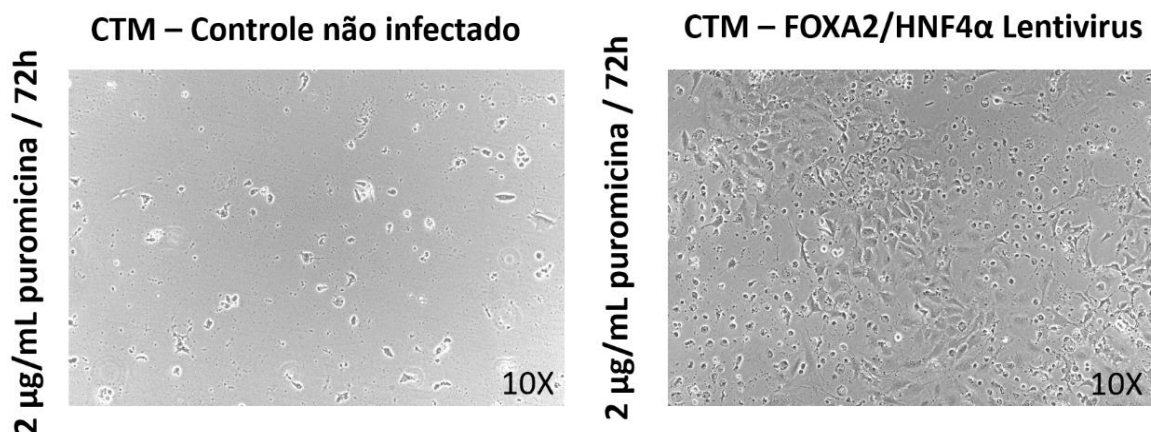


Figura 13. Seleção de clones transduzidos através da resistência à puromicina. As CTM foram expostas à puromicina durante 72 horas, tempo que foi suficiente para que as células transduzidas com os lentivírus apresentassem resistência ao antibiótico, conforme visualizado por microscopia por contraste de fase. Magnificação de 100x

5.11 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM MODIFICADA E ACOMPANHAMENTO DA REPROGRAMAÇÃO HEPÁTICA

5.11.1 Caracterização morfológica, fenotípica e de expressão gênica

A linhagem de CTM transduzida com os dois lentivírus produzidos foi denominada CTM_FOXA2_HNF4 α . Após seleção dos clones resistentes à puromicina, a linhagem foi cultivada por 15 dias em meio DMEM/F12 suplementado para indução da diferenciação hepática e, ao final do tratamento, foi possível observar colônias com morfologia epitelial característica de hepatócitos expressando a fluorescência GFP conferida pela infecção com o lentivírus contendo o transgene HNF4 α (Figura 14). As CTM não modificadas geneticamente também foram submetidas à cultura com o meio suplementado indutor da diferenciação hepática, porém não foram detectadas mudanças morfológicas e as células não resistiram as condições de cultivo perdendo assim a viabilidade. Células modificadas somente com um dos vetores construídos também não apresentaram mudanças morfológicas após o protocolo de reprogramação.

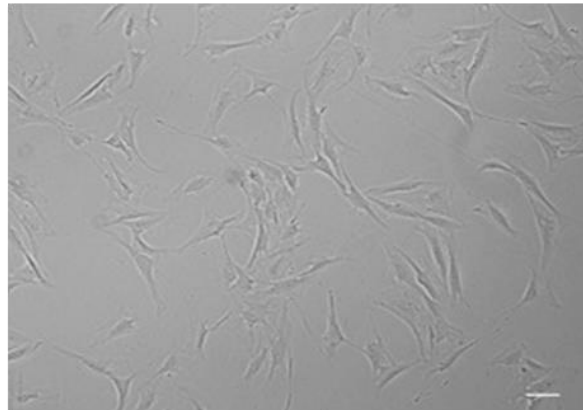
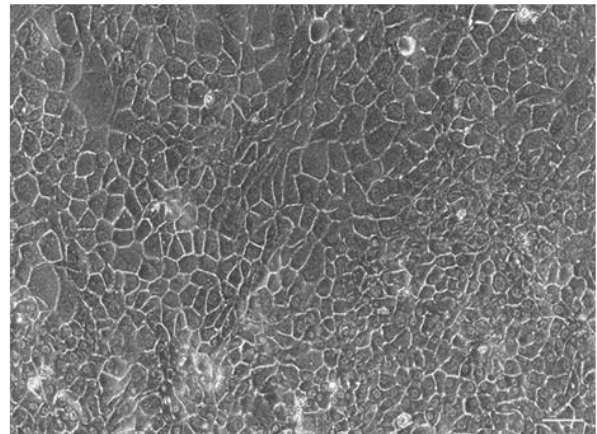
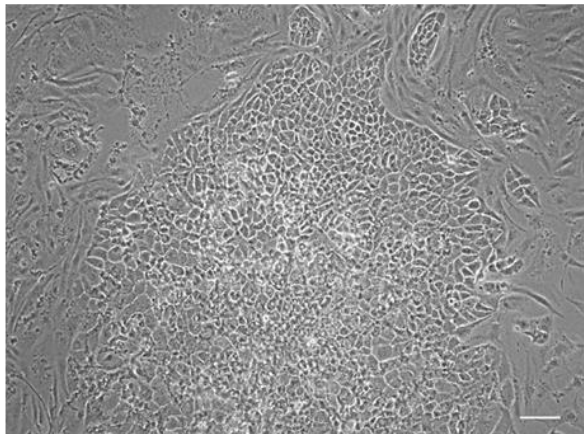
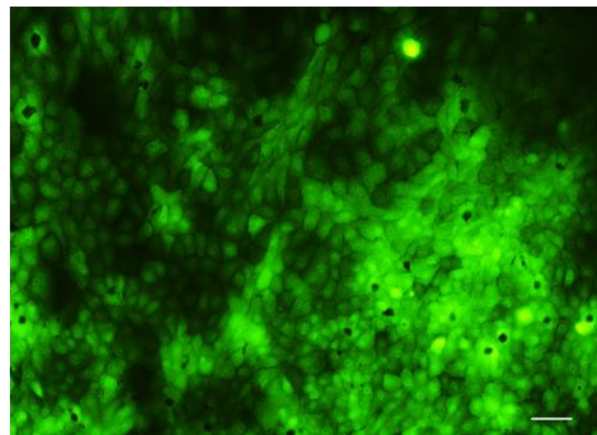
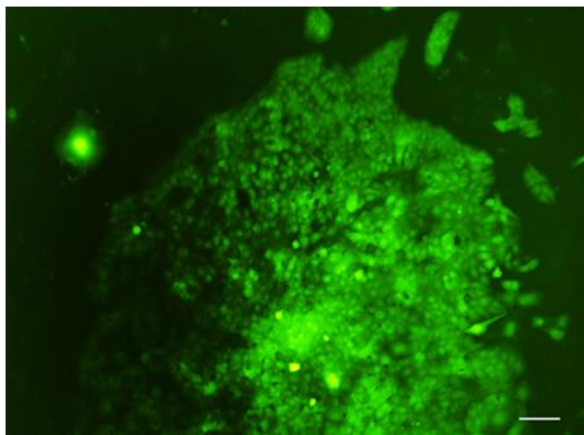
CTM - Controle não transduzidas**CTM_FOXA2_HNF4 α / Colônia epitelial****CTM_FOXA2_HNF4 α / Colônia epitelial GFP**

Figura 14: Colônias com morfologia epitelial. Geração de colônias de células epiteliais após transdução com vetores lentivirais. CTMs não transduzidas (Mock) apresentando morfologia fibroblastoide característica em microscopia de contraste de fase (A). CTM transduzidas com os lentivírus para superexpressão dos transgenes de interesse apresentando colônia com morfologia epitelial após cultivo em meio de diferenciação (B). Imagem aumentada da colônia epitelial presente na imagem B (C). CTM transduzidas com os lentivírus para superexpressão dos transgenes de interesse apresentando colônia epitelial expressando a fluorescência GFP (D). Imagem aumentada da colônia epitelial presente na imagem D (E). Barra: 100 μ m.

As colônias epiteliais foram selecionadas do restante da cultura com perfil mesenquimal através de recorrentes passagens. Após 15 passagens foi observada, por microscopia de contraste de fase, uma cultura epitelial homogênea, sem contaminantes com morfologia mesenquimal a qual foi denominada como *Induced Hepatocyte-like cells* (iHEPs). Foi observado que as células apresentavam alta taxa de proliferação (Figura 15).

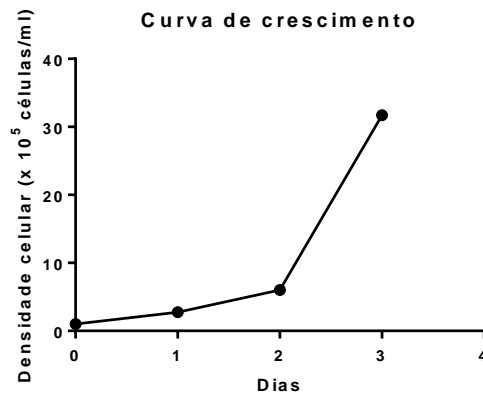


Figura 15. Curva de crescimento das iHEPs. As células foram cultivadas do dia 0 (1×10^5 células) até o dia 3 após o plaqueamento.

O RNA mensageiro dessa cultura foi extraído para análise da expressão gênica de marcadores hepáticos por RT-qPCR. Foi observado um elevado nível de expressão dos marcadores hepáticos albumina (Alb), tirosina aminotransferase (TAT), alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-fetoproteína (AFP) e citoqueratina 18 (CK18), quando comparados com os níveis de expressão das CTM controles não reprogramados. O perfil de expressão desses marcadores hepáticos nas iHEPs também foi comparado ao de hepatoblastos isolados de fígado fetal murino no 13º dia embrionário, para que assim fosse possível caracterizar o nível de maturação das células reprogramadas. Pode-se observar que as iHEPs apresentaram níveis de expressão dos marcadores de maturação hepática albumina, TAT e AAT semelhantes ou maiores aos dos hepatoblastos. Quando comparadas às CTM, as iHEPs exibiram um aumento significativo na expressão do marcador fetal AFP e do marcador epitelial CK18, entretanto, esses níveis de expressão apresentaram-se reduzidos em relação aos hepatoblastos (Figura 16).

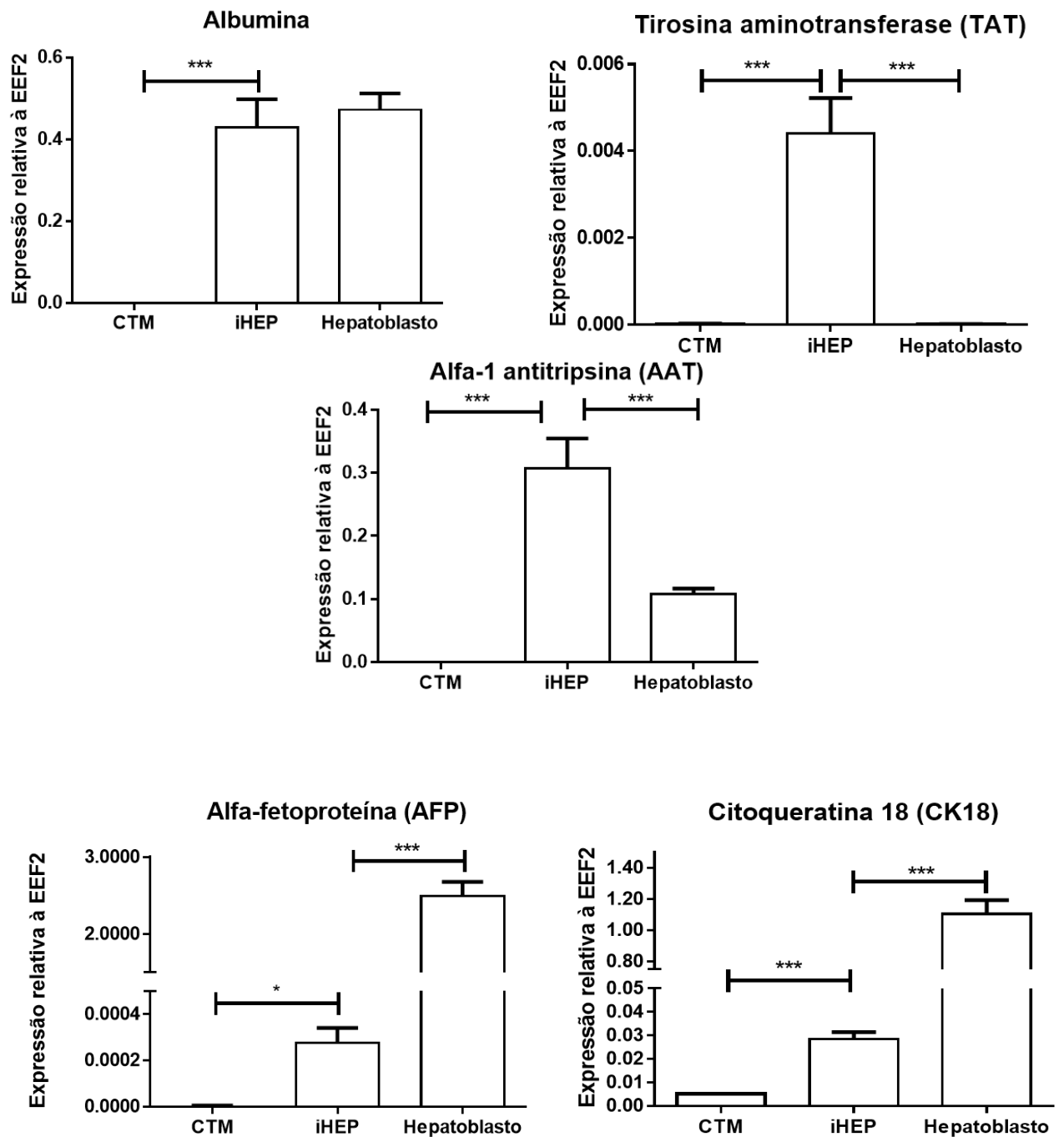


Figura 16: Análise da expressão de genes associados à diferenciação hepática. Resultados de análises de qRT-PCR, demonstrando expressão relativa de albumina, TAT, AAT, AFP e CK18 nas iHEPs comparada à expressão nas CTMs controles não reprogramadas e em hepatoblastos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0001$.

De forma complementar, foi possível observar nas iHEPs, por técnica de imunofluorescência a presença da molécula de adesão celular característica de culturas epiteliais E-caderina, assim como a presença de grânulos citoplasmáticos de albumina e marcação positiva para FOXA2 e CK18, foram utilizadas como controle CTMs que apresentaram marcação negativa para os marcadores hepáticos avaliados (Figura 17).

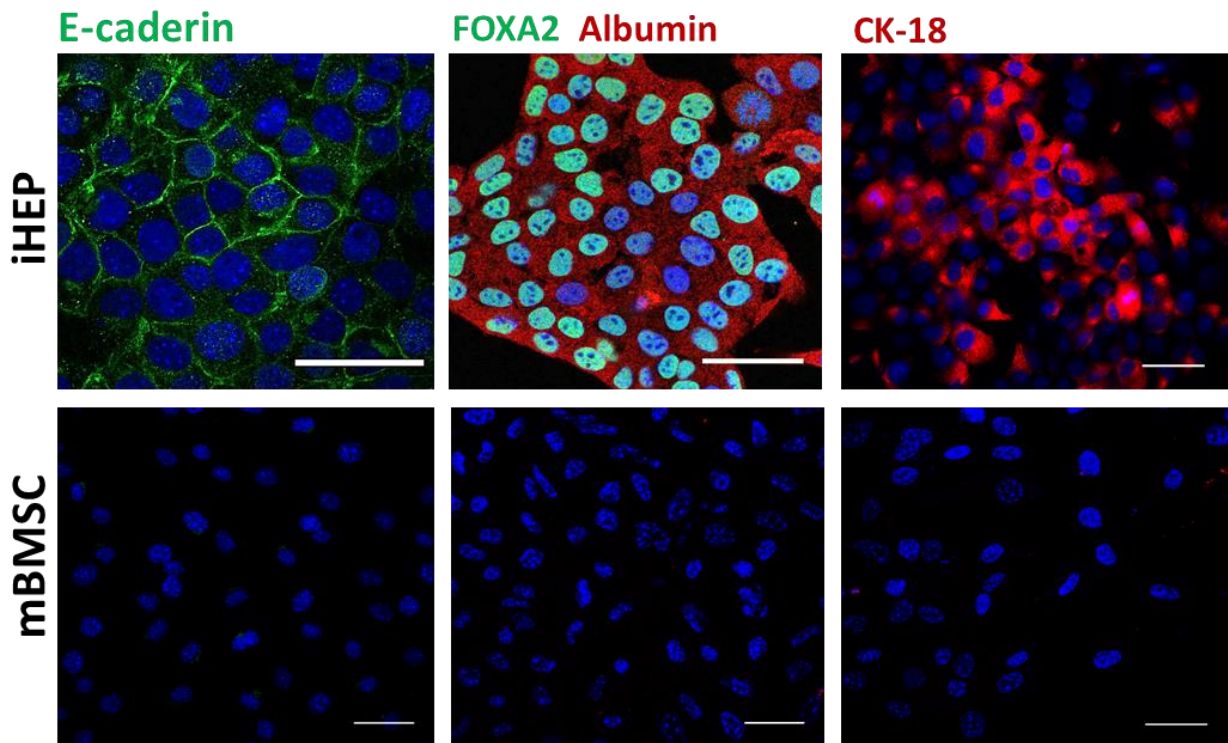


Figura 17: Caracterização das iHEPs por imunofluorescência. Imagem de microscopia de fluorescência confocal demonstrando a expressão de E-caderina (verde), FOXA2 (verde) e albumina (vermelho) e CK18 (vermelho). Núcleos são visualizados em azul pela coloração por DAPI. Foram utilizadas como controle CTMs. Barra representa 100 µm.

5.11.2 Caracterização funcional das iHEPs

Após a detecção de marcadores hepáticos por qRT-PCR e imunofluorescência, as características funcionais das iHEPs foram investigadas. A depuração de indocianina verde (ICG) pode ser utilizada para análise funcional do hepatócito, uma vez que hepatócitos primários são capazes de captar essa substância excreta-la novamente na bile (HASHIMOTO, M.; WATANABE, 2000). Foi observado que as iHEPs possuíam essa característica funcional pois captaram a ICG após uma hora de incubação e liberaram a mesma 4 horas após a remoção da ICG do meio de cultura. A capacidade de reserva de glicogênio e lipídios também foi detectada nas iHEPs pela coloração de PAS (glicogênio) e Oil red O (lipídios). O acúmulo de

lipídios na cultura também foi observado pela captação de lipoproteína acetilada de baixa densidade (Ac-LDL) marcado com a sonda fluorescente (Figura 18). Em todos os ensaios funcionais CTM foram utilizadas como controle não apresentando nenhuma característica funcional avaliada.

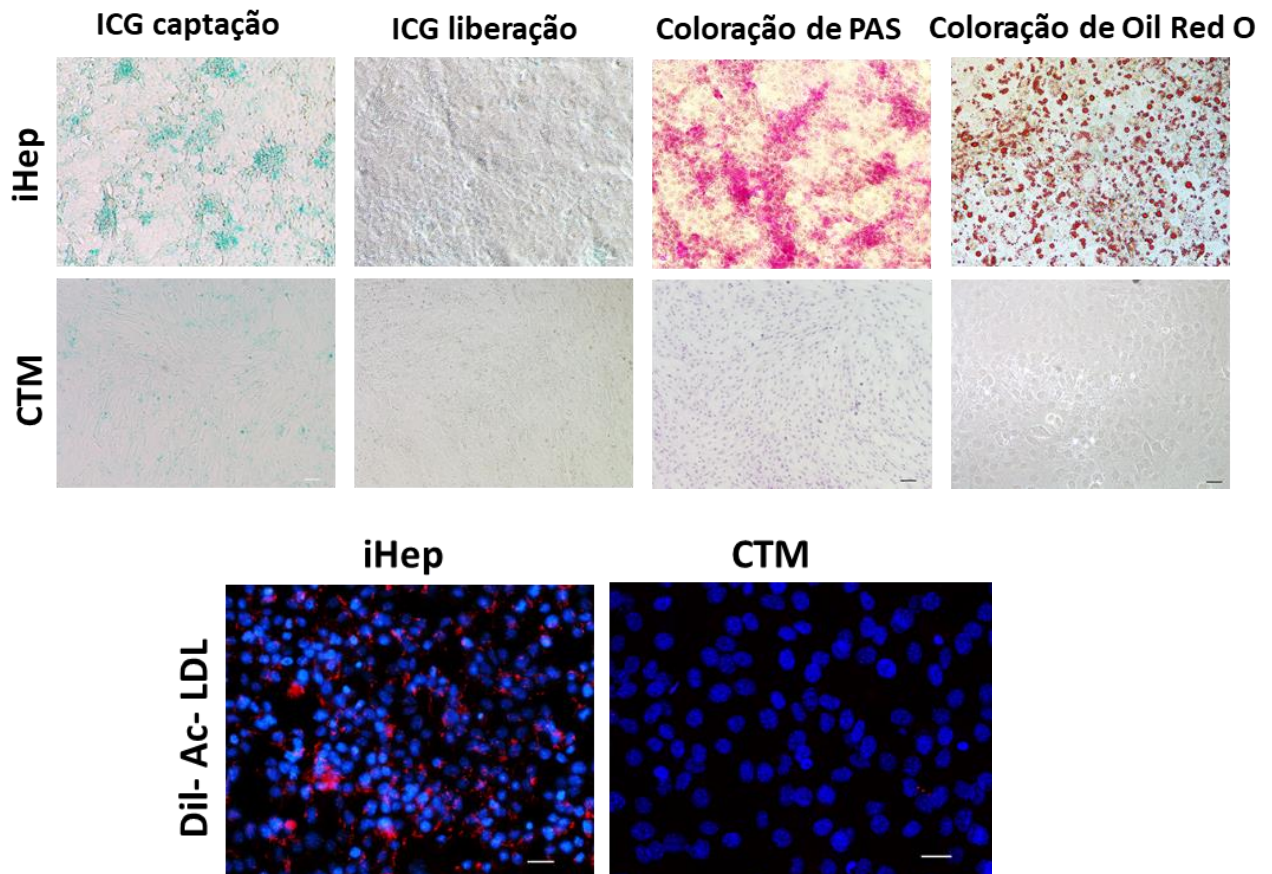


Figura 18: Análise funcional *in vitro* das iHeps. Ensaio de captação de ICG após 1 hora de incubação e liberação da mesma 4 horas após sua remoção (ICG captação e liberação). Coloração de PAS para detecção de glicogênio, coloração de Oil Red O para detecção de lipídios, e fluorescência vermelha de lipoproteína acetilada de baixa densidade (DiI-Ac-LDL) marcado com sonda fluorescente para análise de captação de lipídios, núcleos em azul marcados por DAPI. Foram utilizadas como controle CTMs. Barras: 50 μ m.

A capacidade de metabolização de drogas pelas iHEPs foi avaliada através da análise da expressão gênica e atividade das enzimas do complexo citocromo P450. Foi observado um aumento nos níveis de expressão das enzimas CYP3A11, CYP1A1 e CYP3A44 na cultura de iHEPs após incubação com drogas indutoras (dexametasona, fenobarbital, rifampicina ou omeprazol) (Figura 19). A atividade da enzima CYP3A4 foi observada pela metabolização de seu substrato luminescente após incubação com dexametasona (Figura 20). Em conjunto esses

dados sugerem que a linhagem iHEP gerada a partir de reprogramação direta apresenta características funcionais comuns a hepatócitos primários.

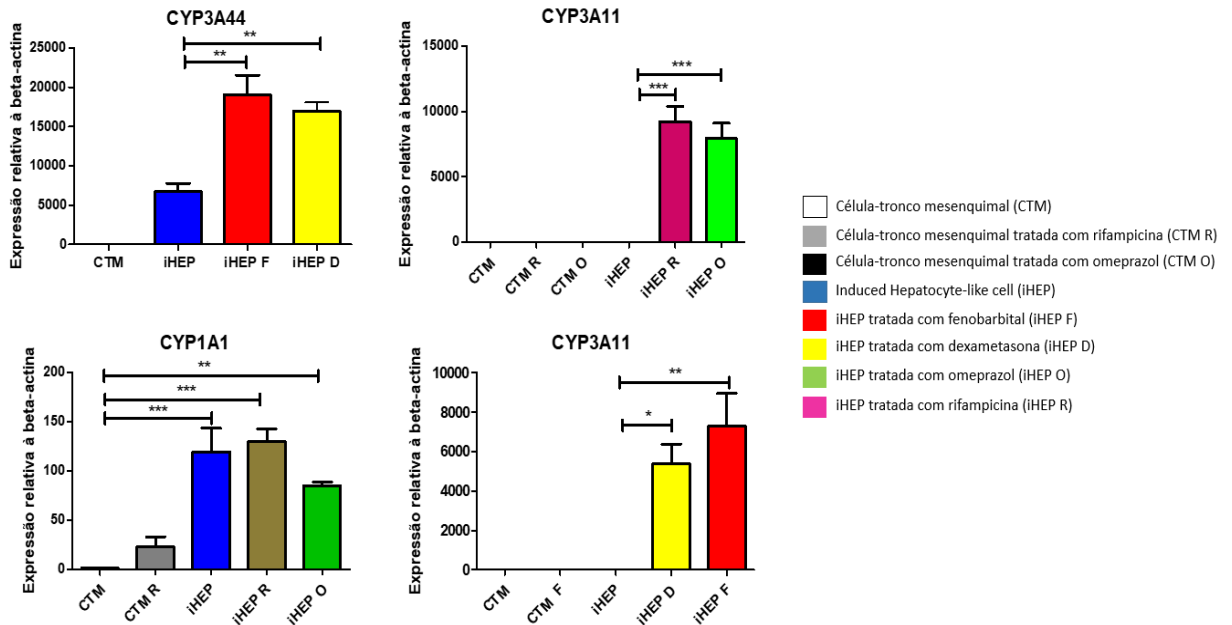


Figura 19. Análise da capacidade de expressão gênica de enzimas do complexo citocromo P450 nas iHEPs. A cultura foi incubada 48 horas com drogas indutoras e em seguida investigada a expressão de genes relacionados ao complexo por qRT-PCR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0001$.

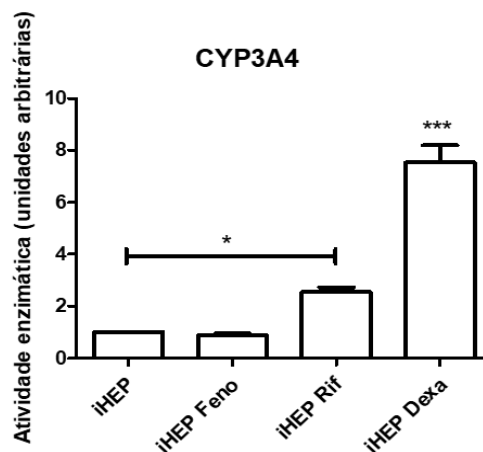


Figura 20. Quantificação da atividade da enzima CYP3A4 em resposta às drogas indutoras fenobarbital, rifampicina e dexametasona. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0001$.

5.12 CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS iHEPs

Foi observado por microscopia eletrônica de transmissão diferenças ultraestruturais entre o conteúdo citoplasmático das iHEPs e CTM. Após a reprogramação hepática, foi possível observar um aumento significativo na quantidade de mitocôndrias presentes nas iHEPs em comparação com as CTM, assim como a presença de vacúolos lipídicos característicos de hepatócitos, ausentes nas CTM (Figura 21).

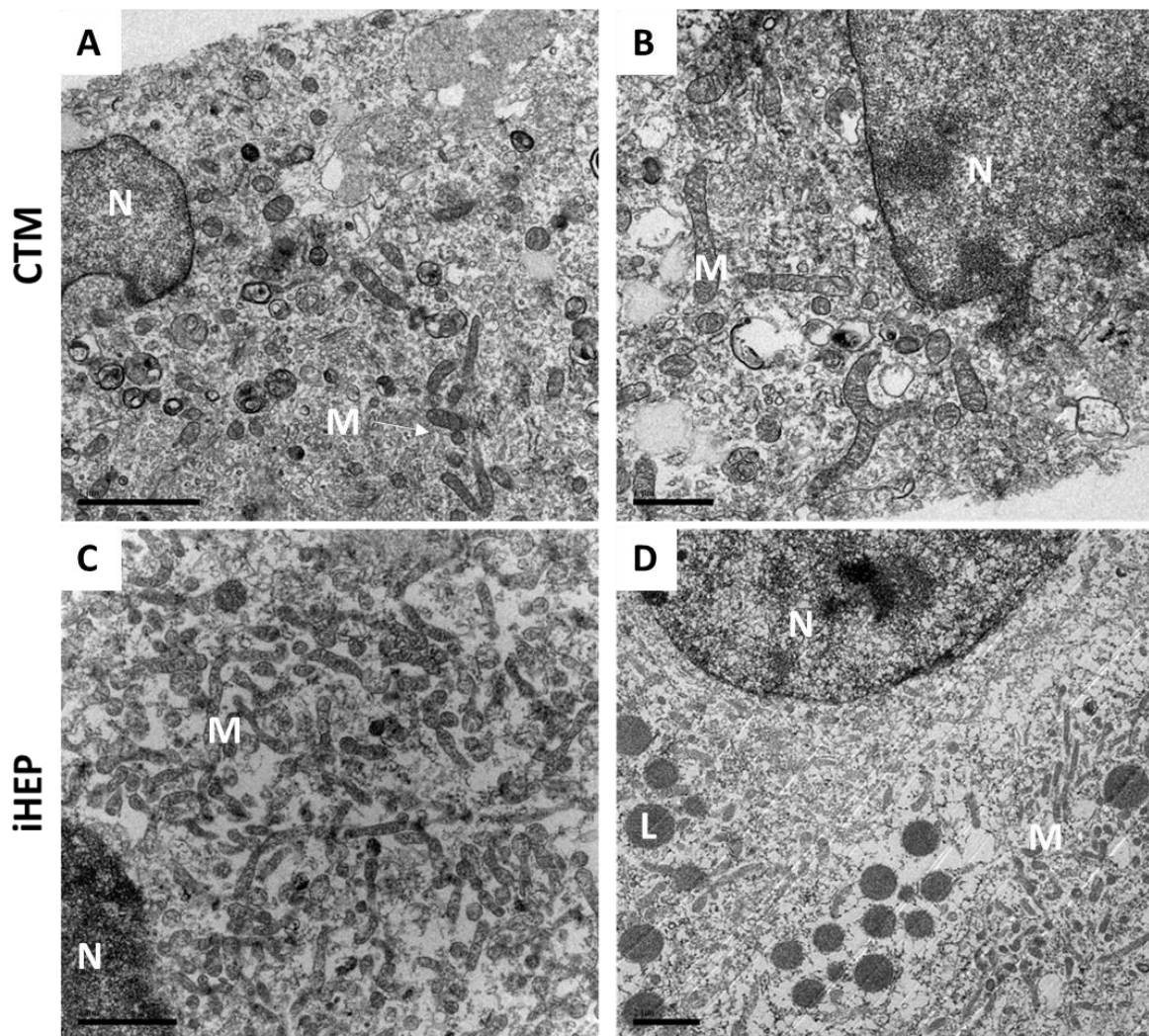


Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão das CTM e iHEPs. Em A e B podem ser observadas estruturas citoplasmáticas das CTM como núcleo (N) e mitocôndrias (M) que se apresentam em menor número quando comparadas as mitocôndrias presentes nas iHEPs (C e D). Em D também pode ser observada a presença de vacúolos lipídicos (L). Barra: 2 μ m.

Buscando aprofundar a investigação acerca da diferença no conteúdo mitocondrial atribuída ao processo de reprogramação hepática das CTM, a quantidade de mitocôndrias entre iHEPs, CTM e hepatócitos primários foi comparada pela marcação com MitoTracker Red FM (ThermoFisher Scientific). Foi observado por citometria de fluxo que a intensidade de fluorescência associada ao marcador de mitocôndrias apresentou-se maior nas iHEPs comparadas às CTM aproximando-se mais da marcação observada em hepatócitos primários. Também foi possível observar na aquisição das iHEPs a presença de uma população com menor intensidade de marcação, sugerindo uma menor quantidade de mitocôndrias viáveis (Figure 22).

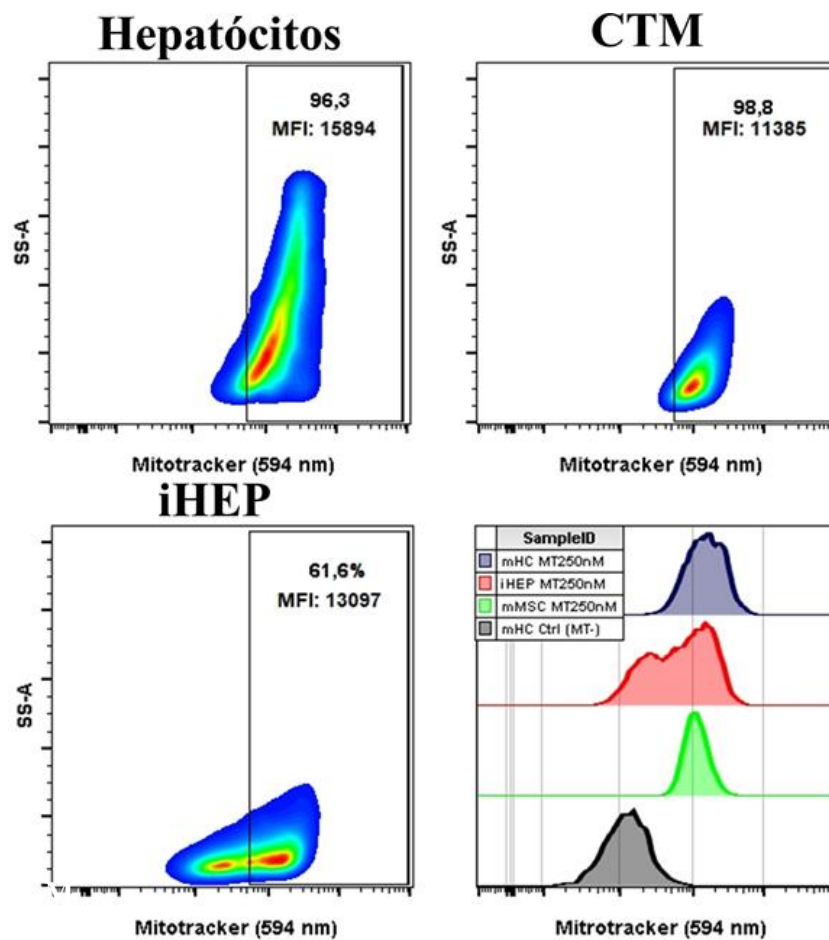


Figura 22. Citometria de fluxo para análise do conteúdo mitocondrial das iHEPs, CTM e Hepatócitos por marcação com MitoTracker Red FM na concentração de 250 nM. Histograma da intensidade de fluorescência (MFI) associada aos hepatócitos (mHC MT250nM), iHEPs (iHEP MT250nM), CTM (mMSC MT250nM) e controle não marcado (mHC Ctrl (MT-)).

5.13 MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DAS iHEPs POR CONTEÚDO MITOCONDRIAL CITOPLASMÁTICO

Em busca de um método para isolamento de células na cultura das iHEPs com características citoplasmáticas mais semelhantes a hepatócitos primários, foi realizada a separação de duas populações, com maior e menor intensidade de marcação mitocondrial com MitoTracker Red FM (iHEP MT *high* e iHEP MT *low*) por *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (Figura 23).

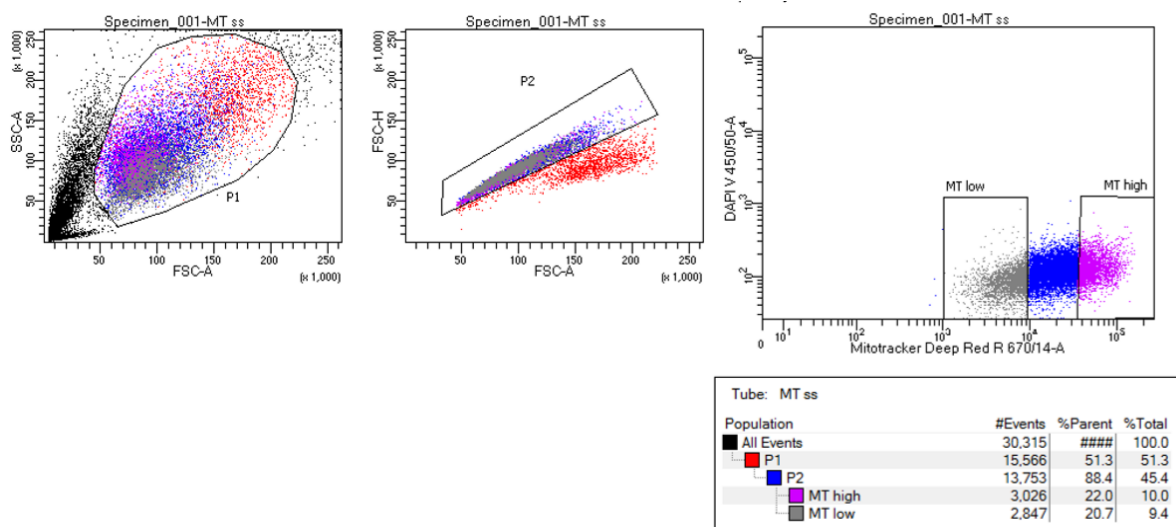


Figura 23. *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) para purificação das iHEPs pelo conteúdo mitocondrial. As iHEPs foram marcadas com MitoTracker Red FM e as populações com maior e menor intensidade de fluorescência foram isoladas por cell sorting.

Após o isolamento de ambas as populações, foi possível observar diferenças morfológicas entre a cultura iHEP MT *high* e iHEP MT *low*, apresentando a primeira uma morfologia epitelial característica de células hepáticas, enquanto a segunda apresentou uma morfologia mais fusiforme e mesenquimal, sugerindo a presença de um montante contaminante de células com perfil mais imaturo e não completamente reprogramadas na cultura das iHEPs (Figura 24).

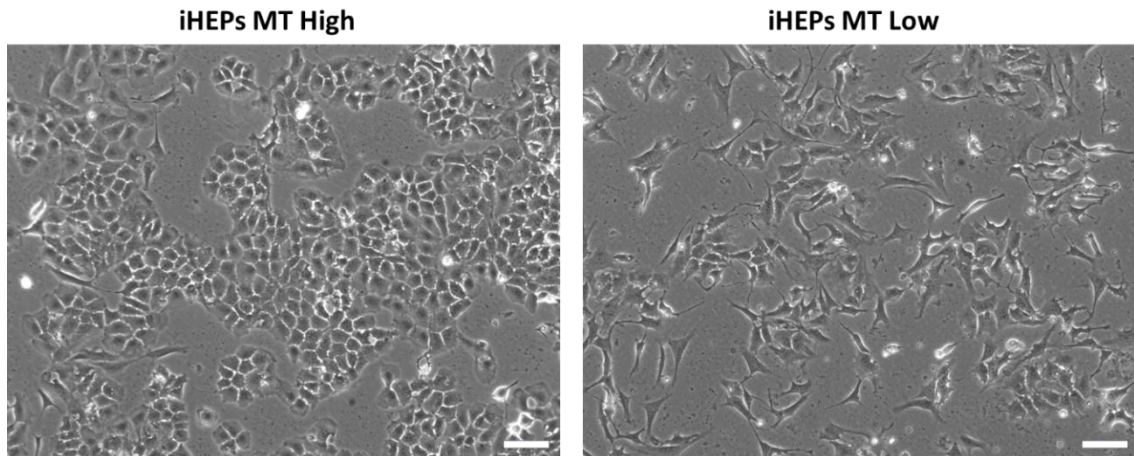


Figura 24. Caracterização morfológica das linhagens iHEP MT *High* e iHEP MT *Low*. Imagem de contraste de fase obtida da cultura de ambas após isolamento por cell sorting. Barra: 100 µm

Os níveis de expressão gênica para marcadores hepáticos entre as duas populações foi comparado e pode-se observar uma maior expressão de albumina, AFP, HNF4 α , Epcam e KRT19 nas iHEP MT *high*, quando comparadas às iHEP MT *low*. Em contrapartida, a expressão do marcador estroma-mesenquimal Sca-1 ainda foi detectada em ambas as populações, contudo, em níveis tendencialmente reduzidos nas iHEP MT *high* (Figura 25).

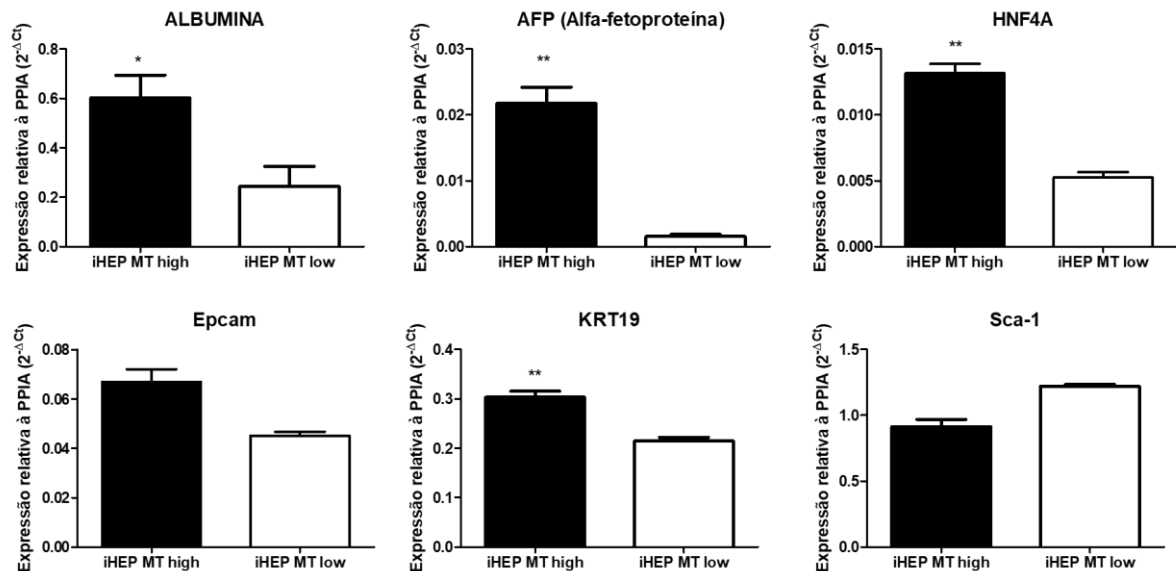


Figura 25. Caracterização das linhagens iHEP MT High e iHEP MT Low por expressão gênica. Resultados de análises de qRT-PCR, comparando a expressão relativa de albumina, AFP, HNF4 α , Epcam, KRT19 e Sca-1 entre as duas populações. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$.

Em conjunto com os dados de expressão gênica demonstrando maiores níveis de expressão do gene HNF4 α nas iHEP MT *high*, também foi observado por citometria de fluxo

uma correlação positiva entre a intensidade da marcação por MitoTracker Red FM e a intensidade da expressão da proteína repórter para GFP (Figura 26).

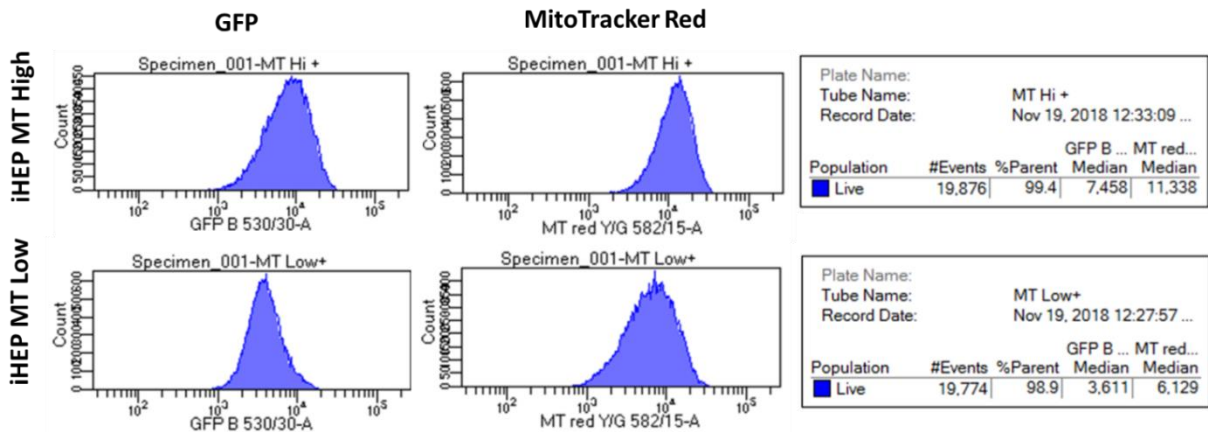


Figura 26. Relação entre intensidade de fluorescência GFP e marcação por MitoTracker Red FM. As iHEPs MT High e iHEPs MT Low foram marcadas com MitoTracker Red FM e analisadas por citometria de fluxo juntamente com a avaliação da expressão de GFP.

Apesar das iHEPs MT *High* apresentarem características morfológicas e de expressão gênica mais similares a células hepáticas, após duas semanas de cultivo foi observado por microscopia de luz a presença de células com morfologia fibroblastóide na cultura. No intuito de investigar a origem dessa população, foi realizada uma imunofluorescência com o marcador de fibroblastos α -smooth muscle actin (α SMA). Foi observada marcação positiva para α SMA em uma população similar morfológicamente à visualizada por microscopia ótica, após quantificação detectou-se que essa população contaminante consistia cerca de 4% do montante total de células (Figura 27). Após quantificação da mesma marcação nas iHEP MT low, foi observado um percentual semelhante de células α SMA positivas ao encontrado nas iHEP MT *high*.

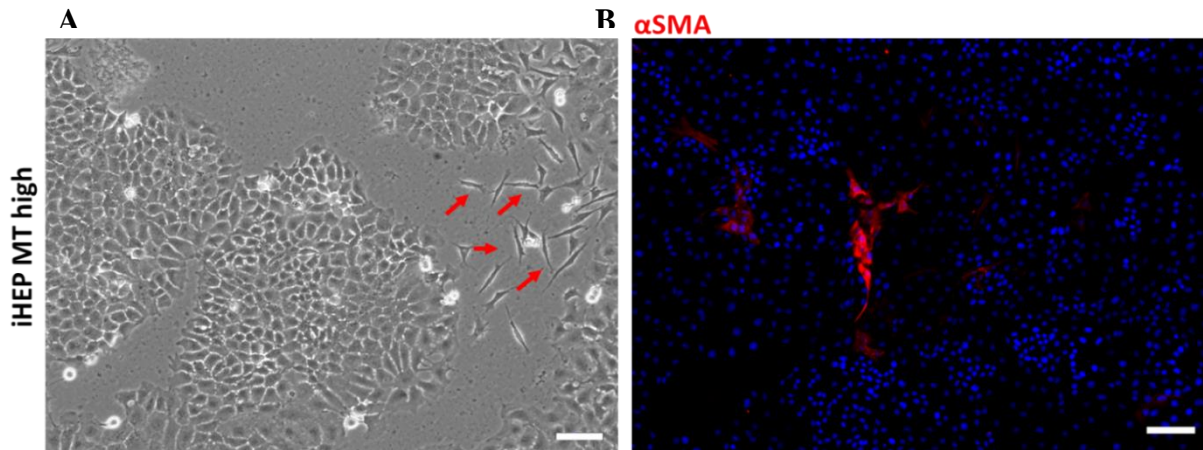


Figura 27. Identificação de população contaminante. Imagem de contraste de fase obtida da cultura de iHEP MT *High* duas semanas de cultivo após seu isolamento, setas vermelhas indicam população com morfologia fusiforme contaminante (A). Imunofluorescência da cultura de iHEP MT *High* marcando células positivas para α SMA em vermelho, os núcleos apresentam-se em azul pela coloração de DAPI (B). Barra: 100 μ m.

5.8 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO HEPÁTICA DAS iHEPs

Uma vez identificadas duas populações com perfis morfológicos e de expressão gênica diferentes na cultura das iHEPs, com o intuito de investigar a capacidade das mesmas de responderem a estímulos indutores de maturação hepática, foram estabelecidos dois protocolos de maturação utilizando as moléculas ácido valproico, parnato (tranilcipromina) e TTNPB juntamente com o meio de cultivo das iHEPs (meio de diferenciação hepática) ou com um meio de maturação contendo dexametasona, SB431642 e oncostatina M. Após serem submetidas ao protocolo utilizando o meio de maturação contendo as moléculas, foi observado o surgimento de uma população com características morfológicas sugestivas de hepatócitos primários em cultura aderente, apresentando células com aparente maior razão citoplasma/núcleo, junções celulares epiteliais, citoplasma denso e presença de células binucleadas com núcleos redondos e claros por microscopia de luz nas iHEP MT *high*. Uma população semelhante também foi observada nas mesmas condições de cultivo das iHEP MT *low*, entretanto numa frequência menor e com ausência de células binucleadas. Não foram observadas modificações morfológicas expressivas nas iHEPs MT *high* ou *low* cultivadas somente com meio de diferenciação hepática suplementado com as três moléculas (Figura 28).

Por análise de expressão gênica, foi observado que ambos os protocolos de maturação induziram uma redução na expressão de alfafetoproteína. A expressão de albumina foi reduzida após ambos os protocolos nas iHEP MT *low*, entretanto somente o meio de maturação proporcionou uma redução nos níveis de albumina das iHEP MT *high*. O mesmo também induziu um aumento na expressão do marcador de células de ducto biliar aquaporina-1 (Figura 29).

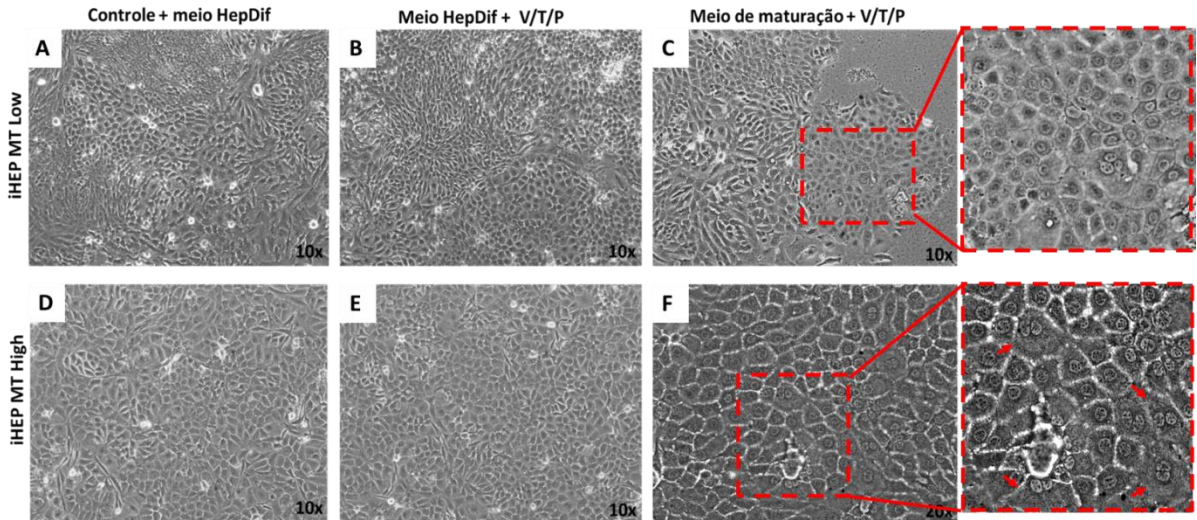


Figura 28. iHEP MT *High* e iHEP MT *Low* após protocolos de maturação. As linhagens foram submetidas a dois protocolos de maturação com duração de 7 dias, A e D representam as células mantidas no meio de diferenciação hepática (controle), B e E representam as células mantidas no meio de diferenciação hepática suplementado com as pequenas moléculas ácido valpróico (V), TTNPB (T) e parnato (P). C e F representam as linhagens cultivadas no meio de maturação suplementado com as três pequenas moléculas (V, T, P). Setas vermelhas em imagem F ampliada apontam células binucleadas. Magnificação: 100X.

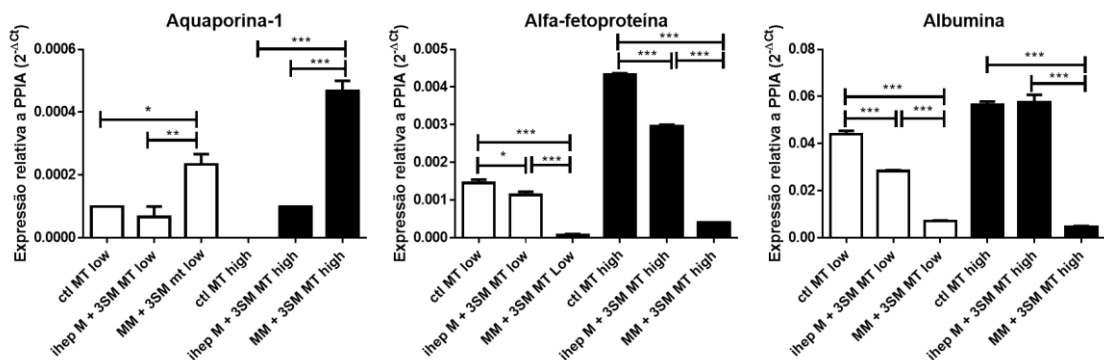


Figura 29. Análise de expressão gênica das iHEP MT *High* e iHEP MT *Low* após protocolo de maturação. Análise de qRT-PCR dos genes aquaporina-1, Alfa-fetoproteína (AFP) e albumina de ambas as linhagens submetidas aos protocolos de maturação testados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

A produção de hepatócitos a partir de CTMs de diferentes fontes, como medula óssea, sangue de cordão umbilical e tecido adiposo, vem sendo extensivamente estudada, uma vez que essas células sob estímulos específicos podem gerar tecidos não mesodérmicos, além de possuírem propriedades imunossupressoras e baixa imunogenicidade que facilitam seu uso no âmbito da terapia celular (TSOLAKI, 2015). Apresentando-se como uma fonte celular de fácil obtenção, isolamento e manutenção em cultura, as CTMs foram utilizadas nesse estudo para a geração da linhagem iHEP pelo método de reprogramação direta utilizando vetores lentivirais na indução da expressão forçada dos genes FOXA2 e HNF4 α . Esse modelo de reprogramação apresenta algumas vantagens, como por exemplo, a eliminação do risco referente a presença de células pluripotentes contaminantes na cultura diferenciada. Essa vantagem reduz a possibilidade de formação de teratomas após transplantes, fato que ainda impossibilita o uso de células diferenciadas a partir de iPSCs ou ESCs como terapia celular na pesquisa clínica. Sendo assim, o presente estudo focou na elaboração de um protocolo de reprogramação hepática a partir de CTM visando principalmente a praticidade, rapidez e produção de uma cultura de células semelhantes a hepatócitos sem perda da capacidade de proliferação. Para isso, a superexpressão dos genes FOXA2 e HNF4 α mostrou-se essencial, uma vez que CTM não transduzidas, quando expostas a condições de cultivo indutoras da diferenciação hepática não se mantiveram viáveis ao final do protocolo, sendo selecionadas pelo meio de cultura suplementado apenas as células modificadas geneticamente que adquiriram um perfil epitelial característico do tecido hepático.

Para induzir a expressão desses genes, foram construídos nesse estudo dois vetores lentivirais com propriedades facilitadoras que proporcionaram o acompanhamento da eficiência do processo de transdução, uma vez que foi possível identificar as células que foram modificadas com ambos os vetores pois as mesmas se tornaram resistentes ao antibiótico puromicina, característica promovida pelo vetor para expressão do gene FOXA2, e ao mesmo tempo apresentaram fluorescência GFP, promovida pelo gene repórter adicionado ao vetor para expressão do HNF4 α . Essa estratégia foi essencial para controlar mais eficientemente as variáveis presentes nos experimentos de reprogramação.

A importância do uso desses dois fatores de transcrição na indução da reprogramação hepática já foi descrita em estudos anteriores, sendo a combinação entre os genes HNF4 α e FOXA1, FOXA2 ou FOXA3 considerada critério mínimo para indução da transdiferenciação

hepática de fibroblastos embrionários de camundongo (SEKIYA; SUZUKI, 2011). Por outro lado, outros estudos já demonstraram que a expressão forçada de somente um fator de transcrição (HNF4 α ou FOXA2) é suficiente para geração de iHEPs expansíveis e com características funcionais, quando combinados a coquetéis de pequenas moléculas e químicos que atuam em vias semelhantes às dos genes substituídos (GUO, 2017; LIM, 2016). No entanto, ambos os fatores de transcrição possuem funções abrangentes sendo reguladores mestres de diversos processos do desenvolvimento embrionário e metabolismo hepático. Um estudo prévio em camundongos adultos com deleção do gene HNF4 α no fígado revelou que este fator é essencial na regulação da expressão de genes chave no metabolismo de drogas, síntese de ácidos biliares, homeostase lipídica, gliconeogênese, ureogênese, adesão celular, proliferação e apoptose nos hepatócitos (LU, 2016). Um dos fenômenos celulares mais importantes mediados pelo HNF4 α é a transição epitélio-mesenquimal/mesenquimal-epitelial (EMT/MET). Sendo este gene um regulador dominante do fenótipo epitelial em células hepáticas inibindo diretamente reguladores da transição EMT e, conseqüentemente, a expressão de genes mesenquimais (NIEHOF; BORLAK, 2009; PARVIZ, 2003; SANTANGELO, 2011). Com equivalente nível de importância, os membros da família de genes FOXA compartilham mais de 90% de homologia em sua sequência de aminoácidos e se ligam a sequências-alvo de DNA similares dentro de regiões reguladoras específicas de hepatócitos. O gene FOXA2 é o primeiro da família a ser ativado durante a embriogênese, no dia embrionário 6.5 (E6.5). Considerados como genes “pioneiros” no desenvolvimento hepático, a família FOXA é descrita como responsável por alterar regulações epigenéticas, deslocando histonas ligadas à cromatina compactada, facilitando assim a ligação de outros fatores de transcrição e por fim induzindo a expressão de genes presentes nas etapas iniciais do desenvolvimento do fígado (FRIEDMAN; KAESTNER, 2006; SASAKI; HOGAN, 1993).

No presente estudo, as CTMs transduzidas com somente um dos fatores de transcrição (FOXA2 ou HNF4 α) não foram capazes de gerar colônias iHEPs após serem submetidas ao protocolo estabelecido. O conjunto desses dados combinados aos relatos da literatura sugerem que a combinação dos dois genes na reprogramação direta é muito eficiente, sendo ainda desafiadora a substituição de ambos por coquetéis químicos. Apesar de alguns estudos citados anteriormente demonstrarem a produção de iHEPs por superexpressão de somente um dos genes utilizados nesse trabalho, o perfil de maturação dessas células ainda é inferior quando comparado ao de hepatócitos primários. A regulação da expressão ectópica desses genes tem potencial para exercer um papel importante na indução da maturação de iHEPs geradas por

reprogramação direta de células somáticas. É possível que a contínua expressão forçada dos transgenes, mesmo sendo necessária para a etapa de reprogramação, possa ser prejudicial para a indução da maturação, resultando em linhagens de células hepatocitárias que possuem características funcionais, porém não o bastante para serem consideradas hepatócitos totalmente diferenciados.

Em consonância com essa hipótese, um estudo prévio demonstrou que o gene FOXA2 exerce funções críticas no início do desenvolvimento embrionário do fígado para formação do endoderma definitivo, no entanto, não é necessário para a manutenção de hepatócitos adultos ou funções hepáticas (SUND, 2000). A contínua superexpressão desse fator de transcrição em iHEPs já estabelecidas pode colaborar para a manutenção do perfil imaturo e proliferativo das mesmas, potencialmente prejudicando a eficiência dos protocolos de maturação desenvolvidos para essas linhagens. Foi observado no presente estudo a presença de células morfologicamente semelhantes a hepatócitos primários em cultura após as iHEPs serem submetidas ao protocolo de maturação desenvolvido, entretanto, a quantidade obtida dessas células comparada ao restante do conteúdo da cultura foi muito baixa, podendo ser observadas diferentes populações com características morfológicas heterogêneas após o término do protocolo.

Análises de expressão gênica demonstraram que o meio de maturação induziu uma majoritária diferenciação biliar, sugerindo um potencial bipotente das iHEPs. As células-tronco hepáticas dão origem tanto aos hepatócitos quanto às células epiteliais dos ductos biliares, também conhecidas como colangiócitos. Durante o desenvolvimento do fígado, os hepatoblastos emergem da endoderme anterior e dão origem a ambos os tipos de células (TANAKA, 2011). Apesar de expressarem menores níveis do marcador fetal AFP e maiores níveis de genes expressos em hepatócitos maduros como TAT e AAT, a característica bipotente e proliferativa das iHEPs sugere que as mesmas se encontram em um estágio de desenvolvimento ainda progenitor, que pode estar sendo induzido pela continuada expressão forçada do fator de transcrição FOXA2. O uso de um vetor que torne possível a expressão controlada desse gene pode favorecer protocolos de maturação e gerar uma linhagem de iHEP mais funcional. Uma vez que o gene FOXA2 poderia ser expresso somente durante a fase inicial de reprogramação, e silenciado durante os protocolos de maturação, mimetizando melhor o que ocorre no desenvolvimento embrionário.

Estudos futuros podem explorar os sistemas de expressão gênica Tet-Off e Tet-On controlados por tetraciclina incorporados em vetores lentivirais, permitindo a geração de

vetores com expressão induzível dos transgenes. Esses sistemas são usados para regular a atividade de genes em células eucarióticas em diversas áreas, variando de pesquisa biológica básica a biotecnologia e aplicações de terapia gênica. Estes sistemas são baseados em elementos reguladores que controlam a atividade do operon de resistência à tetraciclina em bactérias. O sistema Tet-Off permite o silenciamento da expressão gênica pela administração de derivados de tetraciclina (Tc) ou tetraciclina como doxiciclina (dox), enquanto o sistema Tet-On permite a ativação da expressão gênica pelo dox (DAS, 2016).

Também foi identificado nesse estudo que hepatócitos primários possuem um montante mitocondrial superior ao de CTMs, e que esse conteúdo se apresenta aumentado em células submetidas a reprogramação hepática, podendo assim ser utilizado como um marcador importante de transdiferenciação. Vários estudos recentes evidenciaram uma biogênese mitocondrial aprimorada em diversos modelos de diferenciação de células-tronco (CHEN, 2012; XU, 2013). Em modelos de diferenciação hepática de CTMs, já foi evidenciado um aumento na quantidade de mitocôndrias, DNA e proteínas mitocondriais, assim como nos reguladores da sua biogênese e atividade oxidativa. Em contraste, durante a desdiferenciação primária de hepatócitos primários quando mantidos em cultura *in vitro*, foi observada uma redução de várias proteínas mitocondriais envolvidas em processos de fosforilações oxidativas (WANET, 2014). Estas observações sugerem um forte envolvimento das mitocôndrias e do metabolismo mitocondrial na regulação da diferenciação de células-tronco em hepatócitos, podendo o aumento do número de mitocôndrias ser utilizado como um marcador importante a ser acompanhado nesse processo, uma vez que é possível utilizar corantes específicos para essas organelas em células vivas, como foi feito no presente estudo.

Apesar do método de purificação das iHEPs utilizando o marcador mitocondrial MitoTracker Red FM ter selecionado uma população com perfil mais hepaticamente diferenciado, após duas semanas de cultura pôde ser observada a presença de células com morfologia fusiforme mesenquimal, apresentando marcação positiva para o marcador de miofibroblastos α SMA. Essa observação evidencia que mesmo após serem purificadas por recorrentes passagens logo após o surgimento das primeiras colônias de iHEPs reprogramadas, mantidas em meio indutor da diferenciação hepática e mais posteriormente selecionadas pela maior quantidade de mitocôndrias, ainda é possível identificar uma população contaminante na cultura das iHEPs, que pode ser oriunda de células mesenquimais remanescentes do processo de reprogramação, uma vez que CTM compartilham marcadores com fibroblastos e

miofibroblastos, como por exemplo colágeno I, vimentina e α SMA (ALT, 2011). Essa população contaminante também pode ter surgido de uma desdiferenciação das iHEPs, após as mesmas serem cultivadas por muitas passagens (mais de 20) sem alteração na capacidade proliferativa. O cultivo *in vitro* por um longo período pode ter induzido a manutenção de um estado progenitor menos diferenciado e enriquecido essa população contaminante com características mesenquimais. Estudos prévios abordando reprogramação hepática direta a partir de células somáticas demonstram a perda da expressão de α SMA nas iHEPs produzidas ou redução nos níveis de expressão gênica de marcadores fibroblastoides (LIM, 2016; GUO, 2017). No entanto, ainda não há estudos demonstrando a ausência de populações contaminantes após longo período de cultivo e muitas passagens das iHEPs.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que CTM isoladas da medula óssea de camundongos podem ser diretamente reprogramadas em células com características fenotípicas, de expressão gênica e funcionais semelhantes a hepatócitos, através da superexpressão dos fatores de transcrição FOXA2 e HNF4 α , juntamente com a exposição prolongada a um meio de cultivo suplementado indutor da diferenciação hepática. Mais protocolos para indução da maturação e purificação das iHEPs devem ser explorados em estudos futuros para garantir que a linhagem mantenha suas características e possa ser expandida e utilizada em ensaios *in vitro* para testes de toxicidade em plataformas de *screening* de novas drogas, estudos do desenvolvimento hepático, e também como uma alternativa terapêutica no tratamento de hepatopatias crônicas e agudas.

REFERÊNCIAS

- ALT, E. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biology of the Cell**, v. 103, n. 4, p. 197–208, 2011.
- ALWAHSH, S. M.; RASHIDI, H.; HAY, D. C. Liver cell therapy: is this the end of the beginning? **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1–18, 2017.
- BIEBACK, K. et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 625–634, 2004.
- BYASS, P. The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. **BMC Medicine**, v. 12, n. 1, p. 159, 2014.
- BYDLOWSKI, S. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.
- CAO, H. et al. Therapeutic potential of transplanted placental mesenchymal stem cells in treating Chinese miniature pigs with acute liver failure. **BMC Medicine**, v. 10, p. 56, 2012.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CHEN, C. et al. Biotechnology challenges to in vitro maturation of hepatic stem cells. **Gastroenterology**, v. 154, n. 5, p. 1258–1272, 2018.
- CHEN, C.-T.; HSU, S.-H.; WEI, Y.-H. Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Biochemistry of Mitochondria, Life and Intervention 2010. v. 1820, n. 5, p. 571–576, 2012.
- CHO, K.-A. et al. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. **Cell Biology International**, v. 33, n. 7, p. 772–777, 2009.
- DAS, A. T.; TENENBAUM, L.; BERKHOUT, B. Tet-On systems for doxycycline-inducible gene expression. **Current Gene Therapy**, v. 16, n. 3, p. 156–167, jun. 2016.
- DHAWAN, A. et al. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 5, p. 288–298, 2010.
- DOMINICI, M.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- DONG, X.-J. et al. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBMMSCs under liver-injury conditions. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 16, n. 26, p. 3267–3278, 2010.

- DU, Y. et al. Human Hepatocytes with Drug Metabolic Function Induced from Fibroblasts by Lineage Reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 394–403, 2014.
- ENGLISH, K.; FRENCH, A.; WOOD, K. J. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 4, p. 431–442, 2010.
- FRIEDENSTEIN, A. J. et al.. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v.17, n.4, p. 331-340, 1974.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY, S., II; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.16, n. 3, p. 381-390, 1966.
- FRIEDMAN, J. R.; KAESTNER, K. H. The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 19, p. 2317–2328, 2006.
- GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, v. 142, n. 12, p. 2094–2108, 2015.
- GUO, R. et al. Chemical cocktails enable hepatic reprogramming of mouse fibroblasts with a single transcription factor. **Stem Cell Reports**, v. 9, n. 2, p. 499–512, 2017.
- HASHIMOTO, M.; WATANABE, G. Hepatic parenchymal cell volume and the indocyanine green tolerance test. **The Journal of Surgical Research**, v. 92, n. 2, p. 222–227, 2000.
- HAYNESWORTH, S. E. et al.. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. **Bone**, v. 13, n. 1, p. 81-88, 1992.
- HE, Y.-Y.; ZHANG, B.-X.; JIA, F.-L. Protective effects of 2,4-dihydroxybenzophenone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 17, n. 21, p. 2663–2666, 2011.
- HERMANN, A. et al. Factor-reduced human induced pluripotent stem cells efficiently differentiate into neurons independent of the number of reprogramming factors. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 4736159, 2016.
- HUANG, P. et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 386–389, 2011.
- IBARS, E. P. et al. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 2, p. 874–886, 2016.
- IGURA, K. et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v. 6, n. 6, p. 543–553, 2004.
- JI, S.; ZHANG, L.; HUI, L. Cell fate conversion: direct induction of hepatocyte-like cells from fibroblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 2, p. 256–265, 2013.

KOGISO, T. et al. Transdifferentiation of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by defined transcriptional factors. **Hepatology International**, v. 7, n. 3, p. 937–944, 2013.

LEE, K.-D. et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1275–1284, 2004.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1044, p. 132–138, 2005.

LIM, K. T. et al. Small molecules facilitate single factor-mediated hepatic reprogramming. **Cell Reports**, v. 15, n. 4, p. 814–829, 2016.

LU, H. Crosstalk of HNF4 α with extracellular and intracellular signaling pathways in the regulation of hepatic metabolism of drugs and lipids. **Acta Pharmaceutica Sinica B, Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. v. 6, n. 5, p. 393–408, 2016.

MALLANNA, S. K.; DUNCAN, S. A. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, v. 26, p. Unit 1G.4., 2013.

MOHAMMADI, Z. et al. A Lentiviral vector expressing desired gene only in transduced cells: an approach for suicide gene therapy. **molecular biotechnology**, v. 57, n. 9, p. 793–800, 2015.

MOKDAD, A. A. et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. **BMC Medicine**, v. 12, 18 set. 2014.

MOORE, L. K.; PERSUAD, T. V. N. **Embriologia básica: introdução a embriologia humana**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

NAGY, P.; BISGAARD, H. C.; THORGEIRSSON, S. S. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v. 126, n. 1, p. 223–233, 1994.

NARDI, N. et al. Terapia gênica. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 109–116, 2002.

NIEHOF, M.; BORLAK, J. Expression of HNF4 α in the human and rat choroid plexus – Implications for drug transport across the blood-cerebrospinal-fluid (CSF) barrier. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 68, 2009.

OMS/WHO. Disease and injury regional mortality estimates for 2008 (cod 2008: deaths by age, sex and cause for the year 2008). **WHO regions**. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_regional/en/index.html. Acesso em: 08 maio 2013.

PAN, X.-P. et al. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from mouse liver progenitor cells via indirect co-culture with immortalized human hepatic stellate cells. **Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT**, v. 15, n. 2, p. 17, 2016.

PARVIZ, F. et al. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 292–296, 2003.

PAUWELYN, K. et al. Culture of mouse embryonic stem cells with serum but without exogenous growth factors is sufficient to generate functional hepatocyte-like cells. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23096, 2011.

POURNASR, B.; ASGHARI-VOSTIKOLAEI, M. H.; BAHARVAND, H. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to hepatocyte-like cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 12, p. 603–610, 2015.

ROMANOV, Y. A. et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 140, n. 1, p. 138–143, 2005.

SANAL, M. G. Cell therapy from bench to bedside: Hepatocytes from fibroblasts - the truth and myth of transdifferentiation. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 21, p. 6427–6433, 2015.

SANTANGELO, L. et al. The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: A novel role for hepatocyte nuclear factor 4 α . **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 2063–2074, 2011.

SASAKI, H.; HOGAN, B. L. M. Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. **Development**, v. 118, n. 1, p. 47–59, 1993.

SCHWARTZ, R. E. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 10, p. 1291–1302, 2002.

SEKIYA, S.; SUZUKI, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 390–393, 2011.

SEO, M. J. et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 1, p. 258–264, 2005.

SNYKERS, S. et al. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 24, 2007.

SOMIA, N.; VERMA, I. M. **Gene therapy: trials and tribulations**. *Nature Review Genetics*, v. 1, n. 2, p. 91-99, 2000.

SONG, G. et al. Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes in vivo attenuates liver fibrosis. **Cell Stem Cell**, 2016.

SUND, N. J. et al. Hepatocyte nuclear factor 3 β (Foxa2) is dispensable for maintaining the differentiated state of the adult hepatocyte. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 14, p. 5175–5183, 2000.

- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.
- TALÉNS-VISCONTI, R. et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 36, p. 5834–5845, 2006.
- TANAKA, M. et al. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. **The Journal of Biochemistry**, v. 149, n. 3, p. 231–239, 2011.
- THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.
- TSOLAKI, E.; YANNAKI, E. Stem cell-based regenerative opportunities for the liver: State of the art and beyond. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 43, p. 12334–12350, 2015.
- VALLIER, L. Heps with Pep: Direct Reprogramming into Human Hepatocytes. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 267–269, 2014.
- VATS, A. et al. Stem cells: sources and applications. **Clinical Otolaryngology and Allied Sciences**, v. 27, n. 4, p. 227–32, 2002.
- VOGEL, K. R. et al. Therapeutic hepatocyte transplant for inherited metabolic disorders: functional considerations, recent outcomes and future prospects. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 37, n. 2, p. 165–176, 2014.
- WAGERS, A.J.; WEISSMAN, L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, p. 639–648, 2004.
- WANET, A. et al. Mitochondrial remodeling in hepatic differentiation and dedifferentiation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 54, p. 174–185, 2014.
- WANG, Wei *et al.* FOXA2 alleviates CCl₄-induced liver fibrosis by protecting hepatocytes in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15532, 2017.
- WATT, F.M.; HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, p. 1427–1430, 2000.
- WILLIAMS, J. T. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **American Journal of Surgery**, v. 65, n. 1, p. 22–26, 1999.
- XU, X. et al. Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 325–332, 2013.
- YU, B. et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 3, p. 328–340, 2013.

YU, J.; YUAN, J.; XU, R. Construction of bone marrow mesenchymal cells-derived engineered hepatic tissue and its therapeutic effect in rats with 90% subtotal hepatectomy. **Cellular and Molecular Biology**, v. 60, n. 3, p. 16–22, 2014.

ZHAO, R.; DUNCAN, S. A. Embryonic development of the liver. **Hepatology**, v. 41, n. 5, p. 956–967, 2005.

ZHOU, Y. et al. Bmi1 is a key epigenetic barrier to direct cardiac reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 382–395, 2016.

ZHU, X. et al. Effects of transplanted bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in animal models of acute hepatitis. **Cell and Tissue Research**, v. 351, n. 3, p. 477–486, 2013.