

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

CAMILA JULIET BARBOSA FERNANDES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
GENETICAMENTE MODIFICADAS NA FIBROGÊNESE HEPÁTICA

Recife
2018

CAMILA JULIET BARBOSA FERNANDES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
GENETICAMENTE MODIFICADAS NA FIBROGÊNESE HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em ciências.

Orientadora: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Coorientadora: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

RECIFE

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- F363a Fernandes, Camila Juliet Barbosa.
Avaliação in vitro do papel de Células-Tronco Mesenquimais geneticamente modificadas na fibrogênese hepática / Camila Juliet Barbosa Fernandes.
- Recife: [s.n.], 2018.
101 p.: il., tab., graf.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
Orientadora: Sheilla Andrade de Oliveira;
coorientadora: Danielle Maria Nascimento Moura
1. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. 2. Cirrose hepática. 3. Células-Tronco Mesenquimais. 4. Fator de Crescimento de Hepatócitos. 5. Células Estreladas Hepáticas. 6. Terapia genética. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Moura, Danielle Maria Nascimento. III. Título.

CDU 616.36-004

CAMILA JULIET BARBOSA FERNANDES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PAPEL DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
GENETICAMENTE MODIFICADAS NA FIBROGÊNESE HEPÁTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em ciências.

Data de aprovação: 27/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Departamento de Imunologia/Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dra. Christina Alves Peixoto

Departamento de Entomologia/Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr. Renato Antonio dos Santos Oliveira

Departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

À minha família, em especial aos meus pais, Ana e Antônio

AGRADECIMENTOS

À Deus por não me desamparar ao longo desses dois anos cheios de novidades e desafios, pela força e coragem em momentos difíceis.

À minha família pelo suporte e apoio incondicional, dedicação e estímulo, em especial aos meus pais.

Às orientadoras Dra. Sheilla Andrade de Oliveira e Dra. Danielle Maria Nascimento Moura, palavras não são suficientes para demonstrar a gratidão pela oportunidade, pela constante troca de conhecimentos e pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional, sem vocês nada disso seria possível.

Aos amigos do laboratório de imunopatologia e biologia molecular que foram essenciais nessa conquista, obrigada por todos os momentos de descontração, risadas, companheirismo, por tornarem meus dias mais leves, e não menos importante, por todo suporte científico e metodológico dado no decorrer desses dois anos, por me mostrarem como o trabalho em equipe é importante, vocês são partes fundamentais desse trabalho.

Aos amigos da turma de mestrado, que Deus colocou no meu caminho durante essa jornada, pelas conversas, pela amizade, pelo conforto dado nos momentos de tensão, pelo incentivo e pela força.

Às amigas de faculdade e escola que acompanharam de perto ou de longe, mas dando força, apoio e incentivo, acima de tudo compreendendo minha ausência em momentos importantes.

Aos et al., do trabalho Dr. Antonio Pereira, Dra. Valéria Pereira e Dra. Maria Carolina Accioly.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) pela infraestrutura fornecida para desenvolvimento deste projeto, à Vice Presidência da Fiocruz Rio de Janeiro e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

FERNANDES, Camila Juliet Barbosa. **Avaliação *in vitro* do papel de Células-Tronco Mesenquimais geneticamente modificadas na fibrogênese hepática.** 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

O potencial terapêutico de células da medula óssea tem sido bastante investigado no campo da medicina regenerativa. Embora os resultados iniciais de ensaios pré-clínicos e clínicos com células da medula óssea em doenças hepáticas sejam bastante promissores, os efeitos terapêuticos não são duradouros. Assim, maiores estudos vêm sendo realizados com o objetivo de otimizar a terapia celular. Dentre as populações de células-tronco, as células-tronco mesenquimais (CTMs) se destacam por apresentarem plasticidade genômica e características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica. Um dos fatores imunomodulatórios secretados pelas CTMs é o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), cuja participação em processos antifibróticos e antiinflamatórios já é descrita. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial antifibrogênico de CTMs superexpressando HGF na fibrogênese hepática. Para atingir os objetivos propostos, as CTMs foram obtidas de medula óssea de camundongos C57BL/6 e caracterizadas. O RNA total foi extraído de tecido hepático de camundongos da mesma linhagem para obtenção do gene *Hgf* que foi amplificado por PCR, clonado no vetor de expressão pCMV-LacZ e transfectado nas CTMs. A transfecção se mostrou eficiente pela análise da expressão do *Hgf* feita por RT-PCR. As CTMs modificadas foram co-cultivadas por 48h com células estreladas hepáticas (CEHs) da linhagem GRX. citocinas e a expressão do marcador da fibrogênese hepática, alfa-actina de músculo liso (α -SMA) foram quantificados, onde foi observado um aumento na secreção de IL-6 e redução de TGF β 1. Os baixos níveis de α -SMA observados, juntamente com os achados da caracterização ultraestrutural e molecular da linhagem GRX, demonstraram que estas células podem não se encontrar no seu fenótipo ativado, reforçando a necessidade de uma observação mais criteriosa para a utilização desta linhagem em estudos *in vitro* da fibrogênese hepática.

Palavras-chave: Terapia celular. Fibrose hepática. Células-Tronco Mesenquimais. Fator de Crescimento de Hepatócitos. Células Estreladas Hepáticas.

FERNANDES, Camila Juliet Barbosa. **In vitro evaluation of the role of genetically modified Mesenchymal Stem Cells in hepatic fibrogenesis.** 2018. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

The therapeutic potential of bone marrow cells has been extensively investigated in the field of regenerative medicine. Regarding liver disease, although initial results from preclinical and clinical trials using bone marrow cells are quite promising, the therapeutic effects are not long-lasting. Thus, more studies have been carried out with the aim of optimizing cell therapy. Among the populations of stem cells, the mesenchymal stem cells (MSCs) stand out because they present genomic plasticity and immunomodulatory and immunosuppressive characteristics that increase the possibilities of therapeutic use. One of the immunomodulatory factors released by MSCs is the hepatocyte growth factor (HGF), whose participation in antifibrotic and anti-inflammatory processes is already described. Thus, the present work aimed to evaluate the antifibrogenic potential of MSCs overexpressing HGF in hepatic fibrogenesis. To achieve the proposed objectives, the MSCs were obtained from bone marrow of C57BL/6 mice and characterized. Total RNA was extracted from livers from the same lineage mice to obtain the *Hgf* gene that was amplified by PCR, cloned in the expression vector pCMV-LacZ and transfected into the MSCs. The transfection proved to be efficient by the analysis of HGF expression by RT-PCR. Modified CTMs were co-cultured for 48h with hepatic stellate cells (CEHs) of the GRX lineage and cytokine and hepatic fibrogenesis marker expression, smooth muscle actin – α (α -SMA), were evaluated and was observed an increase in IL-6 secretion and reduction of TGF β 1. The low levels of α -SMA observed, together with the findings of the ultrastructural and molecular characterization of the GRX lineage, demonstrated that these cells may not be in their activated phenotype, reinforcing the need of a careful observation for the use of this lineage *in vitro* studies of hepatic fibrogenesis.

Key words: Cell therapy. Hepatic fibrosis. Mesenchymal stem cells. Hepatocyte Growth factor. Hepatic Stellate Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mudanças na arquitetura hepática associada aos eventos da fibrose...	18
Figura 2	Ativação dos miofibroblastos e seu papel na fibrogênese e na manutenção da fibrose	20
Figura 3	Representação esquemática das propriedades das CTMs na fibrose hepática.....	31
Figura 4	Estrutura e funções biológicas do HGF.....	36
Figura 5	Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM –T-Easy.....	45
Figura 6	Representação esquemática do vetor de expressão pCMV-LacZ	46
Figura 7	Representação Esquemática do co-cultivo indireto.....	49
Figura 8	Cultivo de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea de camundongos.....	54
Figura 9	Células-tronco mesenquimais diferenciadas e coradas.....	55
Figura 10	Imunofenotipagem para os marcadores de superfície das Células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	56
Figura 11	Cultivo de células estreladas hepáticas da linhagem GRX	57
Figura 12	Confirmação da amplificação do gene <i>Hgf</i>	58
Figura 13	Análise por restrição da construção pGEM-T-Easy_HGF	59
Figura 14	Digestão do gene <i>Hgf</i> , digestão do pCMV-LacZ e purificação do inserto e vetor	60
Figura 15	Confirmação da subclonagem (pCMV_HGF) por digestão analítica....	61
Figura 16	Análise qualitativa da expressão de <i>Hgf</i> nas CTMs 48 horas após a transfecção.....	62

Figura 17	Análise qualitativa da expressão de <i>Hgf</i> nas CTMs 96 horas após a transfecção (48 horas após o co-cultivo).....	63
Figura 18	Dosagem dos níveis de IL-6 e TGF- β 1 nas células GRX 24 e 48 horas após co-cultivo de CTMs superexpressando <i>Hgf</i> com Células estreladas (GRX).....	64
Figura 19	Caracterização ultraestrutural das células GRX por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	66
Figura 20	Caracterização ultraestrutural das células GRX por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	67
Figura 21	Caracterização ultraestrutural das CTMs por Microscopia Eletrônica de Varredura	69
Figura 22	Caracterização ultraestrutural das células CTM por Microscopia Eletrônica de Transmissão	70
Figura 23	Avaliação da expressão de α -SMA por <i>Western blot</i>	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Anticorpos e fluorocromos conjugados utilizados na citometria	42
Quadro 2	Sequência de <i>primers</i> desenhados para amplificação e sequenciamento.....	43
Quadro 3	Sequência de <i>primers</i> utilizados na qPCR, <i>primers</i> desenhados para β -actina (controle endógeno) e α -SMA	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALCAM - Molécula de Adesão Celular Leucocitária Ativada
CEHs – Células Estreladas Hepáticas
CEUA – Comitê de Ética no uso de animais
CD – *Cluster of differentiation*
CTs – Células-Tronco
CTH – Célula-Tronco Hematopoiética
CTMs – Células-Tronco Mesenquimais
CTMMO – Células-Tronco Mesenquimais de Medula Óssea
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dubelcco
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
ELISA- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
EGF – Fator de Crescimento Epidermal
EMT – Transição Epitelial Mesenquimal
FDA - *Food and Drugs Administration*
HGF – Fator de Crescimento de Hepatócitos
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
ICAM - Molécula de Adesão Intercelular
IFN- γ – Interferon - γ
IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IL – Interleucina
LB – Luria Bertani
LSECs – Células Endoteliais Sinusoidais
LFA-1 - Antígeno 1 Associado à Função leucocitária
Ly6A – Antígeno de linfócito 6 A
MCI – Massa Celular Interna
MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos – 1
MEC – Matriz Extracelular
MMP – Metaloproteinase de Matriz
NASH – Esteatohepatite Não Alcoólica
NGF - Fator de Crescimento Neural
NK – *Natural killer*

PCR – Reação em Cadeia Polimerase

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

RFP- Proteína Fluorescente Vermelha

RPM – Rotações Por Minuto

RTqPCR - *quantitative real time polymerase chain reaction*

α -SMA – α – Actina de músculo liso

SCA-1 – *Stem cell antigen -1*

SBF – Soro Bovino Fetal

TGF – β - Fator de Crescimento e Transformação - β

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

TIMP – Inibidor de Metaloproteinase Tecidual

UV – Ultravioleta

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VCAM-1 - Molécula de Adesão Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Fibrose Hepática.....	16
2.1.1 Principais células e moléculas sinalizadoras na fibrogênese hepática.....	17
2.1.2 Reversão e tratamento da fibrose hepática.....	21
2.2 Terapia celular para fibrose hepática	22
2.3 Células-tronco e Terapia Celular.....	23
2.4 Células-tronco mesenquimais e Terapia Celular para fibrose hepática.....	27
2.5 Células-tronco geneticamente modificadas.....	31
2.6 HGF.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo geral.....	39
4.2 Objetivos específicos.....	39
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	40
5.1 Experimentação Animal.....	40
5.2 Obtenção de Células-Tronco Mesenquimais de Medula Óssea (CTMMO).....	40
5.3 Diferenciação Osteogênica e Adipogênica das CTMMO.....	41
5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	41
5.5 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	42
5.6 Clonagem	43
5.6.1 Desenho dos oligonucleotídeos	43
5.6.2 Amplificação do gene HGF	44
5.6.3 Clonagem em pGEM –T-Easy.....	44
5.6.4 Subclonagem em pCMV-LacZ.....	46
5.7 Transfecção das CTMs.....	47
5.8 Co-cultivo de CTM modificadas e de CEHs.....	48
5.9 Análise da expressão do HGF.....	49
5.10 RTqPCR.....	50
5.11.1 ELISA.....	50
5.11.2 CBA.....	50

5.12 Análise ultraestrutural	51
5.12.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	51
5.12.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	52
5.13 Análise da ativação das CEHs da linhagem GRX	52
5.14 Análises estatísticas	53
5.15 Considerações Éticas	53
6 RESULTADOS	54
7 DISCUSSÃO	73
8 CONCLUSÕES	83
9 REFERÊNCIAS	84
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	101

1 INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas crônicas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, caracterizadas em sua maioria pelo estabelecimento do quadro de fibrose hepática (SCHUPPAN; KIM, 2013). No fígado, diversos estímulos, a exemplo, das hepatites virais, doenças alcoólicas e doença hepática gordurosa associada à obesidade podem incitar uma resposta inflamatória que estimula a produção de matriz extracelular (MEC) em quantidade exacerbada, resultando no desenvolvimento de fibrose (HERNANDES-GEA; FRIEDMAN, 2011).

A fibrogênese se deve, principalmente, à ativação e alteração fenotípica das células estreladas hepáticas (CEHs), que em estado normal encontram-se quiescentes no espaço perisinusoidal de Disse (MORMONE; GEORGE; NIETO, 2011). Quando são ativadas por estímulos parácrinos e autócrinos, as CEHs liberam seus depósitos de vitamina A e adquirem um fenótipo semelhante à miofibroblasto, passando a expressar α -SMA (α -actina de músculo liso) e a produzir componentes da matriz extracelular (MEC) em grandes quantidades levando a deposição exacerbada MEC e consequente substituição do parênquima hepático por tecido de cicatrização (DUFFIELD et al., 2013, HERNANDES-GEA; FRIEDMAN, 2011, JIANG; TÖRÖK, 2013, ROCKEY, 2013).

Os tratamentos existentes para as hepatopatias são limitados e diferenciados a depender da causa e/ou persistência do estímulo. Em geral, as terapias conseguem, apenas, minimizar os danos aos tecidos, reduzindo as complicações associadas à doença. Dessa forma, os pacientes podem evoluir para forma crônica da doença com a presença do quadro de cirrose e falência hepática. Nesses casos, o transplante do fígado passa a ser a única opção terapêutica efetiva (JIANG; TÖRÖK, 2013). Nesse contexto, o desenvolvimento de novas terapias que promovam uma diminuição das lesões teciduais e consequente reestabelecimento da função do órgão se faz necessário (MORMONE; GEORGE; NIETO, 2011).

Dentre as possíveis alternativas terapêuticas, a terapia celular tem se destacado nos últimos anos (MURACA, 2011). A utilização de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM) vem se tornando uma opção atrativa no tratamento de doenças crônico-degenerativas (VOLAREVIC, 2014). Estas células, também conhecidas como células do estroma medular, são células-tronco não hematopoiéticas multipotentes (VOLAREVIC, 2011) e têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo (ROUFOSSE et al., 2004).

Estudos experimentais têm demonstrado que as CTMs são capazes de se diferenciar em hepatócitos *in vitro* (LEE et al., 2004, LUK et al., 2005, SHU et al., 2004) e *in vivo* (FANG et al., 2004, JIANG et al., 2002), além de participarem da regeneração de áreas com lesão com restabelecimento da função de órgãos como o pulmão, o coração e o fígado (MANGI et al., 2003, ORTIZ et al., 2003). Ensaio clínico com CTMs têm sido realizados e evidenciaram resultados promissores no tratamento da fibrose hepática (AMER et al., 2011, AMIN et al., 2013, LI, T. et al., 2013, JANG et al., 2014b, MEIER et al., 2013).

A maioria dos autores defende que os efeitos benéficos das CTMs em lesões de fígado baseiam-se principalmente nas propriedades imunomodulatórias desempenhadas por essa população celular, que induzem alterações nas funções e apoptose das CEHs (JANG. et al., 2015, XAGORARI et al., 2013). Os efeitos imunomodulatórios promovidos pelas CTMs ocorrem de forma parácrina, através da liberação de fatores chave, tais como o Fator de Crescimento Neural- β (NGF- β), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1). O HGF é um importante fator de crescimento com ações angiogênica, anti-fibrótica e anti-inflamatória (BELL; CAI, 2008, INAGAKI et al., 2008) e é capaz de induzir a diferenciação de CTMs em hepatócitos *in vitro* e aumentar o recrutamento de CTMs para o fígado *in vivo* (OKUMOTO et al., 2003, VAN DE KAMP et al., 2013).

A modificação genética das CTMs para a superexpressão de determinadas moléculas bioativas com objetivo de melhorar os seus efeitos tem sido uma abordagem bastante utilizada. O transplante de CTMs geneticamente modificadas em modelos murinos experimentais têm resultado em melhora no processo de reparo do tecido hepático e diminuição de rejeição de fígados transplantados (LAI et al., 2016, NIU et al., 2014).

Diante do exposto, a proposta desse projeto foi obter células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas superexpressando o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF), com a finalidade de potencializar os efeitos benéficos desta população celular e avaliar a ação parácrina de células-tronco mesenquimais geneticamente modificadas que superexpressam HGF sobre as CEHs, gerando ferramentas que auxiliem no estudo de fatores envolvidos na regeneração de lesões hepáticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fibrose hepática

O fígado é um órgão de extrema importância para homeostase metabólica, realiza síntese, armazenamento e distribuição de nutrientes, produz proteínas e participa do processo de detoxificação do organismo; e por estas razões o tecido hepático é ricamente perfundido. Organiza-se microscopicamente em um padrão sinusoidal, composto em sua maior parte (80% do órgão) por células parenquimatosas: os hepatócitos, que desempenham a maioria das funções hepáticas; e pelas células não parenquimatosas (20% do órgão): os linfócitos, as células de Kupffer, as células endoteliais e as células estreladas hepáticas (CEHs). A organização dos hepatócitos no parênquima dá origem aos lóbulos hepáticos, já as células não parenquimatosas se localizam nos sinusóides hepáticos (vasos localizados entre os hepatócitos), com exceção das CEHs, que encontram-se localizadas entre os hepatócitos e os sinusóides, em uma região conhecida como espaço perisinusoidal de Disse (TAUB, 2004). Em resposta a estímulos agressores, o fígado apresenta capacidade de restaurar completamente a sua arquitetura e massa, através de um processo regenerativo, no qual os hepatócitos entram em divisão e hiperplasia, além de reforçarem sua capacidade de proliferação, através de um mecanismo fisiológico compensatório regulado por fatores de crescimento e citocinas, para reestabelecimento da massa do órgão. Uma vez reestabelecida essa massa, a proliferação é finalizada (OERTEL; SHAFRITZ, 2008, TAUB, 2004).

A regeneração hepática, iniciada a partir da proliferação das células parenquimatosas hepáticas, é necessária para o reparo hepático após lesão. Agressões provenientes de diferentes etiologias, tais como, infecções virais (Hepatite C), uso abusivo de álcool, esteatohepatite não alcoólica (NASH) e doenças auto-imunes, estimulam a interação entre diferentes tipos celulares no microambiente inflamatório, que são recrutadas e passam a liberar biomoléculas, tais como Fator de Crescimento e Transformação- β 1 (TGF- β 1), Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e outros agentes quimiotáticos que participam da regulação da resposta inflamatória. Estas moléculas vão atuar estimulando a síntese e secreção de componentes da MEC que, por sua vez, tem função de manter a estrutura do órgão para futura substituição de áreas lesadas por tecido recém sintetizado e funcionante (DUFFIELD et al., 2013, HERNANDES-GEA; FRIEDMAN, 2011, PELLICORO et al., 2014).

Fisiologicamente, a estabilidade do processo de regeneração hepática é regulada pela secreção de enzimas cálcio-dependentes que degradam especificamente colágeno e

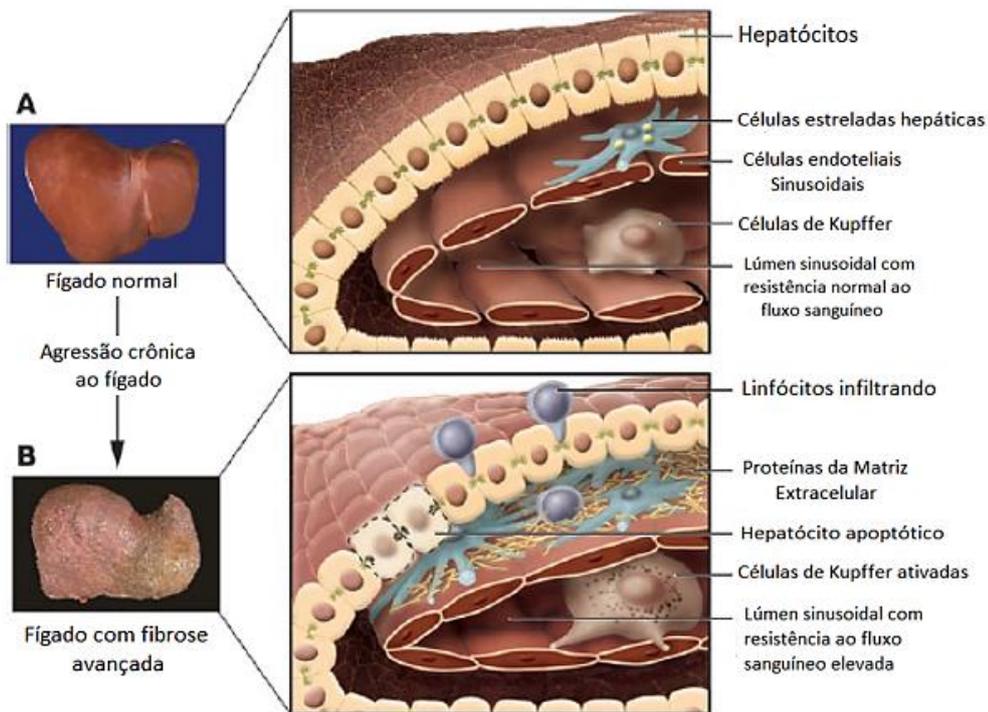
componentes da matriz, as metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores (TIMPs - TIMP-1 e TIMP-2), onde ambos são responsáveis pela manutenção da homeostase e da arquitetura natural do órgão, remodelando o tecido fibroso secretado em um processo equilibrado, autolimitado e regulado de síntese e degradação da MEC (HEMMANN et al., 2007, PELLICORO et al., 2014, ROCKEY, 2013).

Agressões persistentes e contínuas ao fígado resultam na alteração morfológica e funcional do órgão e perda excessiva de células parenquimatosas, associadas ao desequilíbrio entre síntese e degradação de MEC. Tais eventos comprometem a capacidade regenerativa do órgão, favorecendo o processo de cicatrização, que deixa de ser limitado, levando ao acúmulo de tecido denso e fibroso, com função de sustentação. A transformação de um tecido funcional e íntegro para um tecido de cicatrização, disfuncional, pela deposição patológica de componentes da MEC, caracteriza a fibrose (BATALLER; BRENNER, 2005, ELPEK, 2014, JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009).

2.1.1 Principais células e moléculas sinalizadoras na fibrogênese hepática

A resposta celular à inflamação crônica no microambiente da fibrose desempenha papel crucial na fisiopatologia da doença (Figura 1). Dentre as células envolvidas na produção de tecido fibroso durante o reparo hepático estão as CEHs, células residentes do espaço perisinusoidal com capacidade de se diferenciar em miofibroblastos - que são componentes essenciais do processo de cicatrização tecidual - sintetizando e secretando proteínas da MEC, incluindo os colágenos (tipo I, III e IV), proteoglicanos e glicoproteínas de matriz como laminina e fibronectina. A diferenciação de CEHs em miofibroblastos ativados é uma característica chave na fibrogênese hepática, e o acúmulo de miofibroblastos em locais de lesão hepática crônica, secretando componentes da MEC em grandes quantidades, caracteriza o desenvolvimento de fibrose. Os miofibroblastos atuam regulando a resposta fibrótica por meio de suas propriedades cicatrizantes, proliferativas, migratórias, contráteis e imunomodulatórias, sendo um dos principais objetos de estudos da patogênese da fibrose (PELLICORO et al., 2014).

Figura 1- Mudanças na arquitetura hepática associada aos eventos da fibrose.



Fonte: Adaptado de Bataller e Brenner (2005).

Nota: Imagens demonstrando o estado do órgão macroscopicamente antes e depois do processo de fibrose e os principais eventos celulares associados à patologia.

Legenda: (A) Órgão e componentes do tecido hepático conservados e sem alterações. (B) Fígado submetido à lesão crônica em processo de fibrose avançada. As células esteladas encontram-se ativadas, secretando componentes da MEC, os hepatócitos sofrem apoptose, células inflamatórias (linfócitos e células de Kupffer) se infiltram no tecido e tornam-se ativadas e o endotélio perde as fenestrações. Macroscopicamente o órgão tem toda sua arquitetura modificada pela substituição do tecido normal por tecido cicatricial.

Por sua importância na resposta fibrogênica - como principal fonte de miofibroblastos - as CEHs, também conhecidas como lipócitos e células esteladas de Ito, de origem pouco esclarecida, têm sido alvo de muitos estudos para entendimento da base da fibrose hepática (ELPEK, 2014). No fígado, em estado normal, as CEHs atuam como depósito de ácido retinóico para o corpo, armazenando vitamina A e secretando componentes da MEC em pequenas quantidades (XU; ZHANG; WANG, 2012), secretam moléculas imunorregulatórias e moléculas com funções proliferativas, funcionam também como reguladores do fluxo sanguíneo, entretanto sua função mais notável se dá em resposta a danos teciduais (FRIEDMAN, 2008; MORMONE; GEORGE; NIETO, 2011). Após serem estimuladas por citocinas pró-inflamatórias, tais como: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF) β , fator de necrose tumoral (TNF) α , e interleucina (IL) -1, as CEHs passam de um estado de quiescência para um estado ativado, perdendo seus

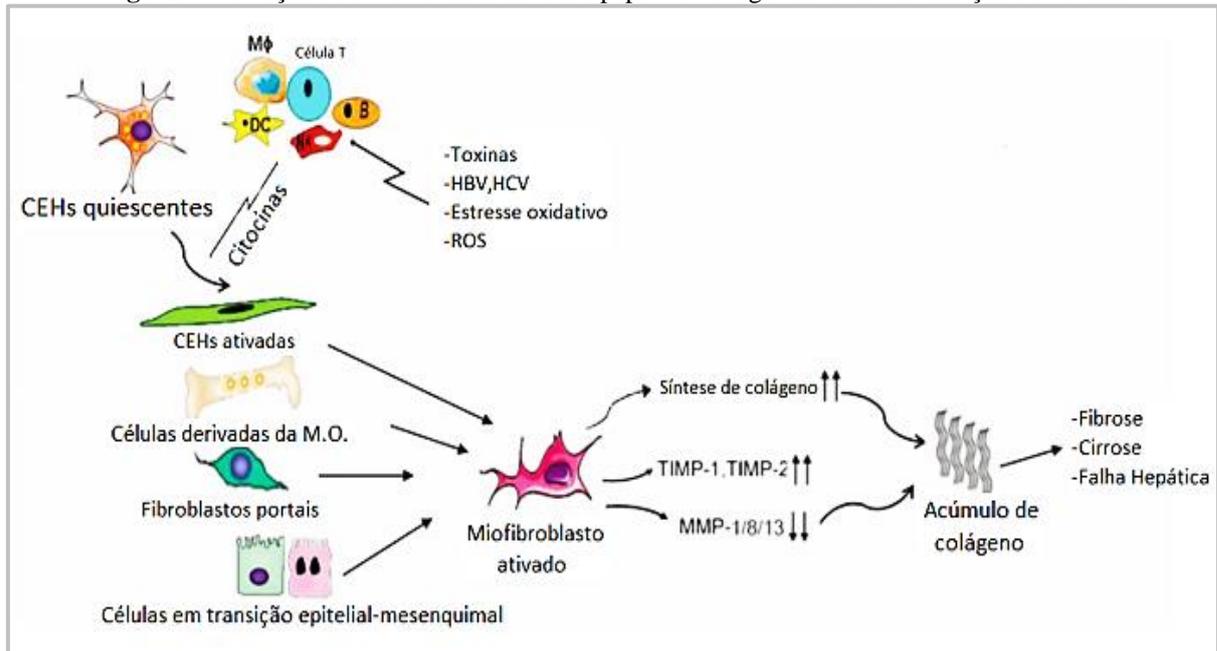
depósitos de ácido retinoico e tornando-se componente central no processo da fibrogênese hepática (HENDERSON; IREDALE, 2007, ROCKEY, 2013, ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014). Quando em estado ativado, as CEHs passam a expressar alguns marcadores específicos, como a α -actina de músculo liso (α -SMA), adquirindo fenótipo de miofibroblastos e propriedades contráteis (BATALLER; BRENNER, 2005, BRENNER, 2009, ROCKEY, 2013).

A ativação das CEHs ocorre em duas etapas: a iniciação, que ocorre quando as CEHs estão mais susceptíveis, devido a modificações da expressão gênica, a ações parácrinas de mediadores inflamatórios e outros estímulos, como excesso de matriz circundando a célula e produtos de hepatócitos apoptóticos, e a perpetuação, onde o estado ativado das CEHs é mantido e a fibrose se estabelece, envolvendo sinalizações parácrinas e autócrinas que fazem com que as CEHs percam seus depósitos de retinóides e adquiram propriedades contráteis, proliferativas, fibrogênicas e quimioatrativas (FRIEDMAN, 2008). Com a persistência de estímulos lesivos, a ativação e diferenciação de CEHs pode também ocasionar a expressão elevada de inibidores de metaloproteinases (TIMPs), favorecendo o processo de fibrogênese pela consequente diminuição da degradação de MEC pelas MMPs (HEMMANN et al., 2007). Além disso, a secreção de TIMP-1 exerce efeitos antiapoptóticos nas CEHs, contribuindo ainda mais para o processo fibrogênico (ELPEK, 2014, FOWELL et al., 2011, PELLICORO; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2012)

As CEHs também contribuem para estabelecimento da fibrose hepática através do desenvolvimento de hipertensão portal e pela síntese MMPs durante as fases iniciais da fibrose (no estágio de iniciação), principalmente MMP2 e MMP9, favorecendo a degradação da MEC normal. São responsáveis também por causar estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio e pela produção de quimiocinas e citocinas, tais como: MCP-1, que promovem a sua migração e quimiotaxia de leucócitos (BRENNER, 2009).

Além das CEHs, outras células contribuem em menor proporção na fibrogênese hepática, atuando como fontes de miofibroblastos, aumentando a quantidade dos componentes da MEC, como por exemplo os fibroblastos portais endógenos e os miofibroblastos derivados de células do parênquima hepático que passam por transição epitelial-mesenquimal (EMT) (BRENNER, 2009, SEKI; BRENNER, 2015) (Figura 2).

Figura 2- Ativação dos miofibroblastos e seu papel na fibrogênese e na manutenção da fibrose.



Fonte: Adaptado de Xu, Zhang e Wang (2012).

Legenda: Estímulos agressores (toxinas, vírus, estresse oxidativo, etc) promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune (células T, células B, células dendríticas, macrófagos), que, por sua vez, atuam na ativação de CEHs quiescentes. As CEHs ativadas são fonte primordiais de miofibroblastos ativados, no entanto, os miofibroblastos podem ser originados por outras populações celulares (células derivadas da medula óssea, células em transição epitelial-mesenquimal e fibroblastos portais). Os miofibroblastos ativados passam a sintetizar fibras colágenas em grandes quantidades, bem como inibidores de metaloproteinases de matriz tecidual (TIMPs) que passam a inibir a degradação de MEC por meio da redução de MMP. O acúmulo de componentes da MEC (colágeno) leva à fibrose tecidual, que pode evoluir para cirrose. O agravamento do quadro de cirrose pode levar à falha hepática.

A interação entre as diferentes células por meio de sinalização parácrina, autócrina ou justácrina no microambiente em que ocorre o processo fibrogênico é de extrema importância para que a fibrose se estabeleça. Os macrófagos residentes no fígado, além dos circulantes, também participam no processo de fibrogênese, secretando citocinas que tem papéis cruciais na condição patológica, como: TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 e interferon (IFN)- γ , que são secretadas a depender do estímulo agressor, sendo o TGF- β identificado como uma importante citocina pro-fibrótica por atuar estimulando a diferenciação das CEHs em miofibroblastos (ELPEK, 2014, XU; ZHANG; WANG, 2012).

Os macrófagos, derivados de monócitos circulantes e residentes proliferam e sofrem alterações fenotípicas e funcionais em resposta a fatores de crescimento e citocinas liberadas no microambiente da lesão, podendo assumir o fenótipo M1, que favorece o processo de fibrose por promover uma resposta pró-inflamatória, e o fenótipo M2, que promove uma resposta anti-inflamatória favorecendo a proliferação de células hepáticas, bem como diminuindo a apoptose destas células (XU; ZHANG; WANG, 2012). As células natural killer (NK) são capazes de induzir a apoptose das CEHs em um processo mediado por IFN- γ , no entanto, as CEHs são

mais propensas à apoptose por células NK no seu estado quiescente, ou nos estágios iniciais de ativação, pela necessidade do ácido retinóico na indução da apoptose de CEHs pelas células NK (ELPEK, 2014, FASBENDER et al., 2016). As células endoteliais sinusoidais (LSECs) podem contribuir para a ativação das CEHs por ação parácrina, de modo semelhante atuam os linfócitos T-helper e as células de Kupffer, estas atuando também na resolução do processo de fibrose (ELPEK, 2014).

2.1.2 Reversão e tratamento da fibrose hepática

O processo de fibrose pode ser revertido e o tecido do órgão ser restaurado, etapa que se relaciona principalmente com apoptose de miofibroblastos e apoptose ou retorno à quiescência de CEHs ativadas (LEMOINNE et al., 2013). Alguns estudos caracterizam o retorno à quiescência das CEHs pela perda da expressão de genes fibrogênicos e expressão de genes adipogênicos, onde são relatados: aumento da atividade de colagenases, diminuição da atividade dos inibidores de metaloproteinases e redução da atividade de CEHs ativadas, havendo relação destes eventos com a participação da interleucina 10 (IL-10). Todo processo ocorre desde que os estímulos sejam retirados e as complicações associadas ao desenvolvimento da cirrose não tenham se instalado (BRANDÃO et al., 2006, LEMOINNE et al., 2013).

O acúmulo de tecido de cicatrização no fígado, decorrente da fibrose, leva à subsequente formação de nódulos regenerativos, e se os estímulos agressores persistem, há o desenvolvimento do estágio mais avançado da fibrose, a cirrose. Na cirrose hepática é possível observar disfunção hepatocelular, alteração do fluxo sanguíneo intra-hepático, podendo resultar em insuficiência do órgão e hipertensão portal, sendo descrita como uma causa crescente de morbidade e mortalidade (BATALLER; BRENNER, 2005, ZHOU; ZHANG; QIAO, 2014). Estudos experimentais demonstram a possibilidade de regressão da fibrose após retirada do estímulo agressor, com a morfologia do órgão retornando a seu estado praticamente normal. No entanto, após lesões persistentes, estudos mostraram que, apesar da retirada do estímulo há desenvolvimento de cirrose e dependendo da severidade, poderia ocorrer apenas uma reversão parcial, permanecendo as lesões nodulares, ficando evidente que a cirrose não se trata apenas de uma forma estendida da fibrose hepática, mas está associada a características bioquímicas que limitam a capacidade de resolução da fibrose, ou seja, quando bem estabelecido o quadro de cirrose, a reversão torna-se um processo cada vez mais difícil (IREDALE et al., 1998, ISSA et al., 2004, PELLICORO; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2012).

Apesar dos vários avanços significativos na compreensão do processo de fibrose hepática, existe ainda um número limitado de medicamentos aprovados para utilização clínica em pacientes com doença hepática avançada. Vários estudos têm visto a apoptose das CEHs como processo chave no tratamento da fibrose e têm buscado meios de indução da apoptose seletiva de células estreladas ativadas (HENDERSON; IREDALE, 2007). Os tratamentos geralmente são direcionados a remoção dos estímulos que impulsionam a cascata fibrogênica e são baseados principalmente em drogas anti-fibróticas que atuam nos pontos chaves do desenvolvimento da fibrose, como as drogas que inibem a ativação, proliferação e na indução da apoptose de células estreladas hepáticas, e em suas propriedades adquiridas após a ativação, na degradação da MEC formada, na supressão do processo inflamatório, entre outros, além dos tratamentos para as doenças de base que culminam na fibrose, ex.: hepatites virais. No entanto, quando a fibrose encontra-se em estágio avançado, existe o risco de o paciente não responder aos tratamentos convencionais, com possível evolução do quadro para cirrose, que em estágios finais, o transplante hepático ortotópico é o único tratamento efetivo (ALTAMIRANO-BARRERA; BARRANCO-FRAGOSO; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2017, BERARDIS et al., 2015, MORMONE; GEORGE; NIETO, 2011, PELLICORO; RAMACHANDRAN; IREDALE, 2012).

2.2 Terapia celular para doenças hepáticas

Em estágios finais de doenças hepáticas crônicas e falha hepática aguda, a única opção terapêutica efetiva é o transplante de fígado. Entretanto, nos últimos anos, o transplante ortotópico de fígado tem sido dificultado pela baixa disponibilidade de órgãos a serem doados, gerando um aumento de morbidade e mortalidade. Além das dificuldades oriundas da captação de órgãos, o transplante hepático é um procedimento invasivo e de alto custo, existindo a possibilidade de rejeição do órgão pelo paciente, o que ocasiona a dependência do uso de agentes imunossupressores, (BERARDIS et al., 2015, ITABA et al., 2015, PEETERS et al., 2000). Em decorrência das dificuldades e empecilhos expostos, a possibilidade de restaurar a massa do órgão e sua função através de transplante de células tem ganhado bastante atenção atualmente (OERTEL; SHAFRITZ, 2008).

Estudos realizados sobre o processo de regeneração hepática ganharam destaque nas últimas décadas especialmente quando a terapia utilizando células alcançou impacto clínico. A busca por populações celulares que supram o processo de perda das células hepáticas e melhorem a condição de vida de pacientes hepatopatas tem sido constante. A terapia celular,

que consiste no tratamento feito através transplante de células com potencial regenerativo ou terapêutico, pode restaurar a função do órgão bem como suas células e representar uma alternativa atrativa ao transplante ortotópico de fígado, sendo um procedimento menos invasivo, podendo atuar em pontos cruciais para o desenvolvimento da fibrose, como: regulando o microambiente inflamatório, atuando diretamente sobre as CEHs, regenerando células hepáticas danificadas, entre outros processos (BERARDIS et al., 2015, PILAT; UNGER; BERLAKOVICH, 2013).

O transplante de hepatócitos fez parte das primeiras tentativas de terapia celular para doenças hepáticas, nas quais hepatócitos foram utilizados e infundidos via veia portal de pacientes em estágio terminal de doença hepática. Foram observados alguns efeitos benéficos, porém limitados. A capacidade dos hepatócitos repopularem fígados mostrou-se pouco eficaz em determinadas doenças hepáticas nas quais a capacidade proliferativa dos hepatócitos é prejudicada, apesar da infusão. Além disso, a natureza da interação desses hepatócitos com os hepatócitos nativos permaneceu pouco clara (HUEBERT; RAKELA, 2014, MITAKA, 1998, MAHIEU-CAPUTO et al.,2004).

A procura por células que proporcionassem melhora em pacientes com lesões hepáticas crônicas, especialmente a fibrose, abriu portas para estudos mais aprofundados sobre o potencial terapêutico das células presentes na medula óssea. A medula óssea apresentou-se como fonte de populações de células heterogêneas com potencial terapêutico para hepatopatias crônicas, onde se incluem as células-tronco derivadas da medula óssea (hematopoiéticas e células-tronco do estroma medular/mesenquimais) (NICOLAS et al., 2016).

2.3 Células-tronco e Terapia Celular

Por definição, célula-tronco é uma célula indiferenciada, capaz de se duplicar, por divisão mitótica simétrica, gerando células- filhas idênticas ou, por divisão mitótica assimétrica dando origem a uma célula-filha idêntica à célula original e outra diferenciada, comprometida com alguma linhagem celular específica, capaz de formar uma variedade de tecidos (RAFF, 2003, SANDERS et al., 2006).

Diferenciação é o processo pelo qual uma célula assume novas características fenotípicas e morfológicas, tornando-se uma célula especializada com funções específicas (THEISE; KRAUSE, 2002). Quanto à plasticidade (capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares), a quantidade de vias de diferenciação e a porção do organismo que é destino final das células, elas podem se classificar em totipotentes, pluripotentes, multipotentes

e unipotentes. As células-tronco totipotentes podem originar qualquer célula de qualquer órgão/sistema do corpo. Podem ser representadas pelo zigoto (união do ovócito com espermatozoide) e pelas células de um embrião recém-formado, desaparecendo logo após as primeiras divisões de um ovócito fertilizado e reaparecendo após a formação da massa celular interna, atuando na formação de todos os tecidos do organismo. São também capazes de originar células de tecidos extraembrionários. As células-tronco pluripotentes são capazes de originar os três folhetos embrionários – ectoderma, mesoderma e endoderma, e se diferenciam das totipotentes por não serem capazes de originar células de tecidos extraembrionários, não sendo capazes também de originar um organismo completo. Como exemplo desta classe existem as células-tronco embrionárias pluripotentes (BONGSO; RICHARDS, 2004, ROBEY, 2000, SOUZA et al., 2003).

As células-tronco multipotentes, representadas pelas células-tronco somáticas (hematopoiéticas e mesenquimais), são células capazes de originar células maduras de tecidos diferentes, entretanto com capacidade mais limitada de diferenciação.

Anteriormente acreditava-se que as células-tronco multipotentes podiam originar apenas as células do tecido das quais derivavam, como as células-tronco hematopoiéticas, mas atualmente sabe-se que o potencial de diferenciação de algumas células antes consideradas multipotentes vai além do seu órgão de origem, podendo ser capazes de originar tecidos diferentes dos quais residem, por isso existem controvérsias a respeito da definição e diferença entre células pluripotentes e multipotentes (DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2009, PEREIRA, 2008, SOUZA et al., 2003). E por fim, as células-tronco podem também se classificar em unipotentes, dando origem a células maduras de um único tipo de tecido, o tecido de origem, responsáveis pela renovação e homeostase tecidual do órgão das quais derivaram, como as células do tecido nervoso adulto. À medida em que o organismo como um todo se desenvolve, o potencial de diferenciação das células-tronco decai gradativamente (BLANPAIN; HORSLEY; FUCHS, 2007, MITALIPOV; WOLF, 2009).

Diversos estudos comprovaram que o processo de diferenciação se relaciona diretamente com a interação do microambiente ou “nicho” (moléculas sinalizadoras, interação entre as células e a matriz extracelular) com as células, influenciando através do controle gênico se a célula vai diferenciar ou não, e, em alguns casos, pela herança de fatores determinantes do destino celular pela célula-mãe (tronco) (SLACK, 2000, SOUZA et al., 2003, SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001, WATT; HOGAN, 2000). Como Galli et al. (2000) demonstraram que as células-tronco neuronais, quando implantadas no músculo esquelético, através de interações com o microambiente, são capazes de produzir células musculares

(GALLI et al., 2000). Zhao et al. (2002), também observaram que, quando transplantadas em tecido neural, as células-tronco originadas na medula óssea eram capazes de se diferenciar em células do tecido neural, além de promover melhoras na atividade neuronal de ratos com isquemia cerebral (ZHAO et al., 2002).

Quanto à origem e fase do desenvolvimento em que são originadas, as células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias e células-tronco adultas/somáticas. Durante o desenvolvimento embrionário, as células do embrião iniciam um processo de divisão subsequente até chegar ao estágio de blastocisto, onde, em camundongos, foi possível observar a primeira etapa de diferenciação, na qual existem populações de células que darão origem aos tecidos extraembrionários e à massa celular interna (MCI), que é encarregada da formação de todos os tecidos embrionários (PEREIRA, 2008). O interesse da comunidade científica pelas células-tronco pluripotentes de murinos se iniciou após o isolamento de uma mistura de células indiferenciadas e células diferenciadas, incluindo células dos folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) de teratocarcinomas, conhecidas como células de carcinoma embrionário (DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2009, FRIEL; SAR; MEE, 2005). No fim da década de 90, as primeiras células-tronco embrionárias humanas foram cultivadas, obtidas de embriões doados, fertilizados *in vitro*, que não estavam aptos para implante. Os embriões foram cultivados até o estágio de blastocistos e as massas internas foram isoladas e cultivadas (DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2009, THOMSON et al., 1998).

As células-tronco adultas são responsáveis por dar origem a células comprometidas com órgãos e tecidos específicos, encontram-se em muitos tecidos adultos, nos quais mantêm a função do órgão, realizam a homeostase tecidual fazendo a reposição celular principalmente no processo regenerativo em resposta a algum dano (PEREIRA, 2008, SANDERS et al., 2006). As células-tronco adultas mais conhecidas por experimentos acerca da plasticidade são as células-tronco da medula óssea, dentre elas estão: as hematopoiéticas e as mesenquimais.

As células-tronco hematopoiéticas são responsáveis pela produção dos diversos tipos de células sanguíneas, que, desde a década de 50 vêm sendo objeto de estudos principalmente com relação ao tratamento de doenças que afetam a hematopoiese (NOWELL et al., 1956, RAFF, 2003). As células-tronco mesenquimais (CTMs), são células presentes no estroma medular, classificadas como multipotentes, capazes de se diferenciar em adipócitos, osteócitos, condrócitos, neurônios, hepatócitos, células musculares e células epiteliais. Além das células-tronco presentes na medula, outros órgãos apresentam células-tronco residentes, como as neurais, no sistema nervoso central, que em cultura são capazes de se renovar e dar origem a

células do tecido de origem (unipotentes) que se diferenciam em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e algumas combinações desses tipos, as células musculares esqueléticas e as células progenitoras adultas, como as células ovais do fígado (PEREIRA, 2008, RAFF, 2003).

As evidências fornecidas acerca da plasticidade das células-tronco e da capacidade do isolamento e cultivo, além do conhecido potencial regenerativo destas células, motivou a utilização de células-tronco na clínica aplicada para diferentes tipos de doenças, como exemplo as patologias hematológicas, câncer e algumas doenças não hematológicas (BURT; TRAYNOR, 1999, LJUNGMAN et al., 2010). A aplicação de enxertos autólogos ou não autólogos tem sido uma prática bastante utilizada para reconstrução de lesões cutâneas muito extensas e graves (KIRBY et al., 2015), a utilização de células-tronco em experimentos com modelos de cardiopatias tem se mostrado promissora, comprovado a regeneração do tecido cardíaco (ORLIC et al., 2001). A transdiferenciação em células neuronais (SANCHEZ-RAMOS et al., 2000) possibilitou o primeiro ensaio clínico aprovado pela FDA em pacientes com lipofucnose ceróide neuronal (doença neurodegenerativa), no qual estudo de fase 1 comprovou a melhora clínica de pacientes com proteção neuronal promovida pelas células-tronco (ROBEY, 2000, SCHWARZ; SCHWARZ, 2010, TROUNSON et al., 2011, VOLAREVIC et al., 2011).

As CTMs derivadas da medula óssea têm sido reconhecidas como fontes promissoras no tratamento de doenças crônicas degenerativas. O transplante das CTMs vem sendo relatado como seguro e amplamente utilizado em ensaios experimentais de doenças hepáticas crônicas (JANG et al., 2014a, LI, T. et al., 2013, PAREKKADAN et al., 2007b, SHAMS et al., 2015), apresentando bons resultados, incluindo redução da fibrose, reestabelecimento da capacidade regenerativa do órgão e melhora nos aspectos funcionais do fígado. Os efeitos terapêuticos das CTMs em hepatopatias crônicas devem-se principalmente às suas características de baixa imunogenicidade quando transplantadas, capacidade de autorrenovação, diferenciação, imunomodulação e migração para áreas de lesões (ASARI et al. 2009, CHAMBERLAIN et al., 2007, CORCIONE et al., 2006, EOM; SHIM; BAIK, 2015, GEBLER; ZABEL; SELIGER, 2012, LEE et al., 2004).

A utilização de células-tronco como terapia alternativa ao transplante e a tratamentos não vigentes para doenças hepáticas crônicas é uma estratégia promissora fundamentada por todas as características benéficas já citadas. No entanto, algumas limitações ainda se fazem presentes, como por exemplo a taxa de sobrevivência das células-tronco quando transplantadas em algum organismo. Estratégias que busquem o aprimoramento dos efeitos destas células são

necessárias e, quando aplicadas, tornam essa população celular ainda mais atrativas para o tratamento de hepatopatas crônicas (ZHAO et al., 2016).

2.4 Células-tronco Mesenquimais e Terapia Celular para fibrose hepática

Os trabalhos realizados pelo patologista Cohnheim na década de 80 levaram a observações da existência de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea, onde se especulava que tais células poderiam ser a fonte de fibroblastos responsáveis pela produção de colágeno no processo de cicatrização. Mais tarde, experimentos comprovaram que estas células de fato existiam e poderiam não só se diferenciar em fibroblastos, como em outros tipos celulares (CHAMBERLAIN et al., 2007, PROCKOP, 1997).

As células-tronco não hematopoiéticas da medula óssea atualmente são conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTMs), estromais ou células do estroma medular. Foram denominadas dessa forma por se localizarem no estroma da medula óssea, surgindo da complexa matriz que funciona como suporte e provê um microambiente para as células-tronco hematopoiéticas, podendo se diferenciar em células do tipo mesenquimais (BYDŁOWSKI et al., 2009, CHAMBERLAIN et al., 2007). São células-tronco multipotentes, capazes de se diferenciar em diferentes linhagens celulares, correspondendo a uma pequena população de células na medula óssea. São passíveis de proliferação e expansão *in vitro*, aderindo-se ao plástico e adquirindo formato semelhante ao fibroblasto (BYDŁOWSKI et al., 2009).

Apesar de serem descritas inicialmente como células pertencentes unicamente ao estroma medular, nos dias de hoje sabe-se que existem CTMs com propriedades *in vitro* bastante semelhantes provenientes de outras fontes como tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, cérebro, músculo esquelético, pulmão, baço, entre outras (FIORE; MAZZOLINI; AQUINO, 2015).

Para caracterizar uma população de CTMs humanas adultas a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) estabeleceu três critérios mínimos, morfológicos, imunofenotípicos e funcionais. São eles:

- a) Capacidade de aderência em superfície plástica, quando em cultivo. Capacidade que funciona como método seletivo, devido à existência de células não aderentes na medula óssea, diminuindo a heterogeneidade celular;
- b) Expressão antígenos superficiais específicos ($\geq 95\%$). Apesar de existirem dados conflitantes acerca da definição correta de marcadores específicos para CTM de humanos adultos, alguns marcadores foram eleitos como mais frequentes nesta

linhagem, apesar de apresentarem expressões variáveis, são eles: CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44 (receptor de hialuronato), CD90 (Thy-1), CD71 e Stro-1 (estroma de suporte da hematopoiese), bem como as moléculas de adesão CD106 (molécula de adesão vascular - VCAM-1), CD166 (molécula de adesão celular leucocitária ativada - ALCAM), molécula de adesão intercelular (ICAM) -1 e CD29 (integrina β). E não devem expressar os marcadores: CD45, CD34, CD14 e CD11 (marcadores de células hematopoiéticas), CD80, CD86 ou CD40 (moléculas co-estimuladoras) e as moléculas de adesão CD31, CD18 (antígeno 1 associado à função leucocitária - LFA-1) ou CD56 (molécula de adesão celular neuronal 1), com expressões dos marcadores de superfície variáveis, a depender do tecido e espécie de origem das células (BYDLOWSKI, et al. 2009, CHAMBERLAIN et al., 2007, MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010). No entanto, a Sociedade Internacional de Terapia Celular determina que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoiéticos, caracteriza imunofenotipicamente as CTMs humanas (MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010);

- c) Por fim, o último critério para caracterização das CTMs é a diferenciação *in vitro* em células da linhagem osteogênica (KULTERER et al., 2007, PARK; LEE; KANG, 2006), adipogênica (DE GEMMIS et al., 2006) e condrogênica (HASHIMOTO; KARIYA; MIYAZAKI, 2006).

O isolamento das CTMs pode ser feito de várias maneiras, entretanto, a mais comum para retirada de células da medula óssea é o gradiente de densidade para obtenção da camada de células mononucleares. O procedimento de cultivo *in vitro* elimina possíveis contaminantes celulares e à medida que as passagens vão sendo feitas, a população celular torna-se mais homogênea, sendo capaz de se expandir numerosamente em cultura, apresentando uma inibição de crescimento quando em densidade muito alta (MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010).

A plasticidade celular em resposta ao microambiente e a estímulos em cultura celular, devido à presença de fatores estimulantes, permite a diferenciação dessas células não somente nas linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, como também em células de outras linhagens, tais como: cardiomiócitos, neurônios e hepatócitos. Woodbury et al., (2000) em seus experimentos puderam observar a diferenciação de CTMs de ratos e de seres humanos em derivados não mesenquimais, mais especificamente neurônios, sugerindo que os mecanismos

que determinam a linhagem celular na qual as CTMs vão se diferenciar podem ser mutáveis e que o microambiente pode estender a capacidade de diferenciação das CTMs muito além das camadas germinativas clássicas (MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010, WOODBURY et al., 2000). As características de plasticidade indicam um papel de renovação celular executado por essas células, sugerindo que esse tipo celular realiza o “turnover” e a manutenção dos tecidos (CAPLAN, 2009).

As CTMs vêm sendo foco de muitas pesquisas em todo o mundo, fornecendo perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular. A medula óssea é uma fonte acessível de CTMs que proliferam facilmente podendo ser uma fonte potencial de hepatócitos e de agentes mitógenos que favorecem a proliferação dos hepatócitos em terapias baseadas em células para doenças hepáticas (Figura 3) (OWEN; NEWSOME, 2015, WATT; HOGAN, 2000).

Schwartz et al. (2002) foram os primeiros a demonstrarem *in vitro* a capacidade das células mesenquimais de medula óssea se diferenciarem em células semelhantes a hepatócitos. Pournasr et al. (2011) induziram a diferenciação de CTMs de medula óssea em células semelhantes a hepatócitos, com características funcionais de hepatócitos como produção de albumina e armazenamento de glicogênio.

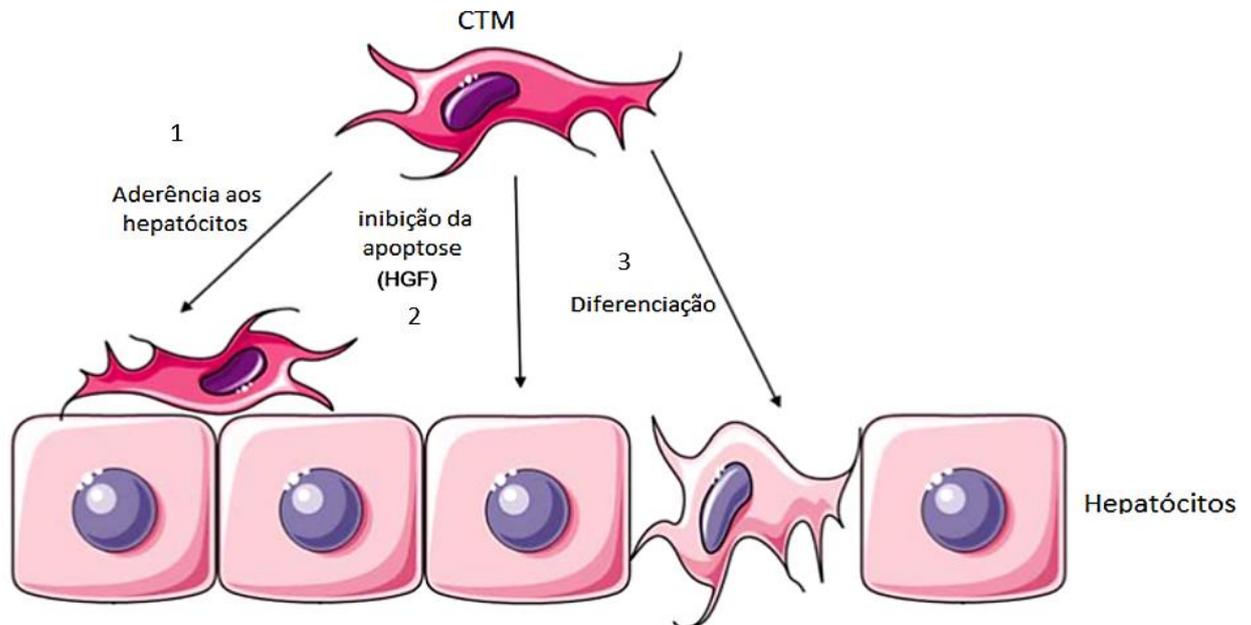
Além da plasticidade celular comprovada pela capacidade destas células de se diferenciarem em células semelhantes a hepatócitos *in vitro* (LEE et al., 2004) e *in vivo* (FANG et al., 2004, JIANG et al., 2002), as CTMs apresentam potencial imunomodulatório importante (WAN et al., 2008), seja por contato direto ou por ação parácrina através da secreção de citocinas e fatores de crescimento com ações angiogênicas (BELL; CAI, 2008), antifibróticas (HIGASHIYAMA et al., 2007, IWAMOTO et al., 2013) anti-inflamatórias (INAGAKI et al., 2008), mitógenas, inibidoras da proliferação de CEHs e redutoras da síntese de colágeno (EOM; SHIM; BAIK, 2015, PAREKKADAN et al., 2007a, SAKAIDA et al., 2004, QUINTANILHA et al., 2014, WANG, P-p. et al., 2012). São também capazes de modular algumas funções das células do sistema imunológico inato e adaptativo através supressão e/ou modulação de células imunológicas (linfócitos, células dendríticas e células NK) (ASARI et al., 2009, CORCIONE et al., 2006, SPAGGIARI et al., 2006, ZHANG et al., 2009). Além disso, as CTMs ainda apresentam perfis de expressão imunogênica reduzidos (baixa expressão de Antígeno Leucocitário Humano – HLA de classe I e ausência de antígenos de classe II do complexo maior de histocompatibilidade), o que torna essas células imunotolerantes e adequadas para utilização em transplante, além de ser possível sua expansão *in vitro* sem perder seu potencial para

aplicações clínicas (CHAMBERLAIN et al., 2007, EOM; SHIM; BAIK, 2015, GEBLER; ZABEL; SELIGER, 2012).

No microambiente fibrótico, os fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas secretados pelas CTMs com ações parácrinas, como: HGF, IGF-1 (fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1), VEGF (fator de Crescimento do Endotélio Vascular), EGF (fator de Crescimento Epidermal), NGF (fator de Crescimento Neural) e TGF- α (fator de Crescimento Transformante Alfa) (SAKAIDA et al., 2004, WANG, L. et al., 2012, ZHANG; JIANG; MIAO, 2011), além de favorecerem a redução do processo inflamatório, podem atuar diretamente sobre a sobrevivência de hepatócitos com lesão e/ou apoptóticos, através de suas ações anti-apoptóticas, mitógenas e angiogênicas, e atuar reduzindo a proliferação de CEHs ativadas e a síntese de colágeno, processo que pôde ser observado *in vitro* através de co-cultivo de CTM e CEHs ativadas, onde foi visto que as CTMs suprimem a proliferação e a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) através da secreção de fatores solúveis (IL-10, HGF, TGF- β , e TNF- α) que inibem a a síntese de colágeno e fatores solúveis que promovem a apoptose das CEHs (HGF e NGF) (PAREKKADAN et al., 2007a).

As CTMs, em resposta a uma lesão, são também capazes de migrar para sítios inflamatórios, interagindo com células residentes e passam a expressar uma variedade de receptores para quimiocinas e fatores de crescimento, que poderão estimulá-las diretamente ou podem induzir a secreção de mais fatores solúveis que podem atuar a longas distâncias, estimulando outras populações no processo de recuperação do tecido danificado e promovendo a quimiotaxia de células envolvidas no processo de reparo (FUCHS et al., 2004, MEIRELLES et al., 2008, MONTEIRO, ARGOLO NETO, DEL CARLO, 2010, MORRISON et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2012). Alguns trabalhos utilizando modelos experimentais investigaram os efeitos da terapia com CTMs na fibrogênese, na falência aguda e na cirrose hepática. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade migratória das CTMs para locais de lesão após o transplante, principalmente para áreas periportais, na grande maioria das vezes com os efeitos potencializados pelos fatores solúveis secretados (VOLAREVIC et al., 2014).

Figura 3- Representação esquemática das propriedades das CTMs na fibrose hepática.



Fonte: Adaptado de Owen e Newsome (2015).

Nota: Propriedades das CTMs no tecido hepático, em resposta à estímulos do microambiente.

Legenda: (1) Capacidade de adesão e interação com os hepatócitos, (2) inibição da apoptose dos hepatócitos mediada pela secreção de HGF, (3) diferenciação em hepatócitos para regeneração de tecido danificado.

As propriedades de não-rejeição das CTMs transplantadas e migração para tecidos com lesão faz estas células representarem uma ferramenta de fornecimento de proteínas terapêuticas, a terapia gênica têm aproveitado essas características das CTMs para direcionamento da expressão de proteínas com potencial terapêutico, a associação da terapia gênica com a terapia celular tem ganhado bastante atenção atualmente.

2.5 Células-tronco Mesenquimais geneticamente modificadas

A terapia utilizando CTMs tem se mostrado um método promissor que aos poucos vem superando as limitações dos tratamentos atualmente disponíveis. A eficácia do transplante de células vem sendo bem reportada, com resultados animadores em modelos de doenças crônicas, agudas e degenerativas, mas algumas limitações ainda se fazem presente, dentre elas está a baixa sobrevivência celular após o transplante. Apesar de todas as características apresentadas e inerentes às CTMs, sua plasticidade, capacidade imunomodulatória, potencial de autorrenovação, imunotolerância quando transplantadas, possibilidade de expansão *in vitro*, fácil cultivo e isolamento, seus efeitos podem ainda requerer adaptação ou modificações que melhorem suas atividades e seu potencial terapêutico (DZAU; GNECCHI; PACHORI, 2005, NOWAKOWSKI et al., 2013, ZHAO et al., 2016).

Tendo em vista a possibilidade de nem todos os fatores secretados pelas CTMs serem benéficos para a mesma doença ou condição, a secreção seletiva de um fator chave para determinada condição patológica, com um direcionamento aprimorado do seu efeito parácrino, poderia melhorar a eficiência terapêutica destas células (WAGNER et al., 2009, ZHAO et al., 2016). Os avanços nos estudos com células-tronco e na biologia molecular e biotecnologia permitiram que novas perspectivas acerca da terapia utilizando CTMs fossem criadas, tornou-se possível manipular o destino e a funcionalidade destas células. Os conhecimentos de engenharia genética e a grande variedade de metodologias já disponíveis fizeram da manipulação genética das CTs uma prática cada vez mais explorada e atraente (NOWAKOWSKI et al., 2013).

Em ensaios clínicos que abordavam a terapia celular para doenças crônico-degenerativas, as principais vias de administração de células foram a intravenosa e a administração direta no local onde ocorreu a lesão. Apesar destas vias de administração já estarem bem estabelecidas, a otimização de técnicas no processo de direcionamento das células para terapia e direcionamento dos seus efeitos pode trazer mais benefícios para o receptor. A superexpressão de alguma molécula bioativa poderia diminuir a necessidade de administração de um grande número de células (1 a 5 milhões de células por kg), juntamente com a redução do custo da produção e manutenção destas células, dos possíveis riscos de efeitos colaterais e minimizando mais ainda a possibilidade da realização de procedimentos invasivos, por mínimos que sejam, como no caso da administração direta (WAGNER et al., 2009).

No intuito de melhorar a sobrevivência de CTMs transplantadas para tratamento de infarto do miocárdio em modelo murino, Zhao et al. (2016) superexpressaram o HGF. Ao avaliarem a sobrevivência das células em condições de hipóxia, puderam verificar que, em comparação as CTMs sem manipulação genética, a sobrevivência foi marcadamente maior, sugerindo que a superexpressão do fator tornou as células mais toleráveis ao ambiente “hostil”. Também observaram a diminuição da apoptose de cardiomiócitos no infarto, bem como a recapilarização das áreas infartadas. Apesar de todas as melhoras observadas, novos estudos refinados acerca dos mecanismos pelos quais as células exerceram estes efeitos foram sugeridos pelos autores. Gao et al. (2007) utilizaram CTMs que superexpressavam o fator VEGF em ratos com modelo de isquemia cardíaca e observaram melhora da função cardíaca através da avaliação dos parâmetros hemodinâmico.

A utilização de CTMs que superexpressam fatores neurotróficos tem sido objeto de estudos sobre os mecanismos protetores que essas populações celulares podem exercer em doenças neurodegenerativas como Alzheimer (LI et al., 2008) , doença de Parkinson (WU et

al., 2010) e doença de Huntington (POLLOCK et al., 2016, WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014). Em 2013 um estudo feito com CTMs de cordão umbilical humano superexpressando o gene HGF, levando em consideração que o HGF sozinho não atravessaria a barreira hematoencefálica por ser uma proteína macromolecular e ter vida curta *in vivo*, mostrou que as CTMs puderam se diferenciar em células semelhantes a neurônios dopaminérgicos, elevando o nível deste neurotransmissor, tirosina hidroxilase e transportador de dopamina, fornecendo evidências de uma possível ferramenta na terapia celular para tratamento da doença de Parkinson (LI, J.F. et al., 2013, SALEHIAND; RAJAEI, 2010). Mais tarde, em 2014, o mesmo grupo realizou um estudo utilizando também a superexpressão do HGF em CTMs, demonstrando que a superexpressão do HGF induziu a regeneração, observada através da recuperação da viabilidade celular, de células com lesão em modelo de doença de Parkinson, cujo mecanismo estava associado à regulação de níveis de cálcio intracelular, sugerindo estudos adicionais para compreender melhor a sinalização envolvida neste tipo de regeneração (LIU et al., 2014).

Um outro estudo envolvendo a utilização de CTMs geneticamente modificadas avaliou os efeitos da superexpressão da citocina IL-10 em CTMs na prevenção da rejeição aguda do transplante hepático. A avaliação feita através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e de análises morfológicas indicou que as células modificadas superexpressando IL-10 promoveram uma melhoria adicional, em comparação com as CTMs normais administradas, na tolerância ao transplante hepático (NIU et al., 2014).

Em experimentos realizados com modelo de fibrose hepática induzida por dimetilnitrosamina em ratos, pesquisadores avaliaram a eficácia terapêutica de CTMs humanas que superexpressavam ectopicamente o HGF. O estudo mostrou que as CTMs que superexpressavam o HGF foram capazes de atenuar o processo de fibrose pela diminuição de citocinas pró-fibrogênicas e recuperação do equilíbrio entre metaloproteinases e seus inibidores, sugerindo que a superexpressão desse gene em CTMs poderia ser uma ferramenta eficaz na terapia da fibrose hepática (KIM et al., 2014).

Os métodos existentes para a construção de uma CTM modificada geneticamente para superexpressar determinado fator/citocina em células eucarióticas são descritos na literatura e alguns deles vêm sendo bastante utilizados. As técnicas não virais, não integrativas (que não integram o DNA de interesse a ser expresso ao DNA da célula receptora) permitem a expressão do gene de modo transiente e promovem a internalização do DNA por meio de estímulos ou agentes facilitadores. Os métodos não virais tornam-se mais seguros devido à sua baixa imunogenicidade (quando comparada à métodos virais) (GUL-ULUDAG et al., 2012), além

disso, são livres das complicações no que diz respeito à utilização de vírus para inserir genes e, apesar de uma menor eficiência quando comparada à transdução viral, são técnicas bem estabelecidas (NOWAKOWSKI et al., 2013). Dentre os métodos mais utilizados estão a utilização de lipídeos catiônicos (MADEIRA et al., 2010), de nanopartículas de cálcio fosfato (CAO et al., 2011), a eletroporação (GEHL, 2003), a microporação (MADEIRA et al., 2011), a nucleofecção (GRESCH et al., 2004), entre outros.

Novas abordagens para modificação genética no intuito de aprimorar ainda mais as ferramentas têm surgido. A nuclease dedo de zinco (ZFN - zinc finger nucleases), as nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALEN - Transcription activator-like effector nucleases) e o sistema CRISPR / Cas são ferramentas de edição genômica, onde cada uma dessas ferramentas pode atuar direcionando com segurança uma sequência específica de DNA a determinados locais e iniciar uma quebra na dupla fita, cuja iniciação endógena de reparo do DNA permite a inserção do gene terapêutico. Estes métodos ainda foram pouco explorados no campo da terapia celular utilizando CTMs geneticamente modificadas, mas têm se revelado um recurso inestimável para a engenharia genética, uma vez que vem sendo cada vez mais utilizados em outras aplicações (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013, WYSE; DUNBAR; ROSSIGNOL, 2014).

2.6 Fator de crescimento de hepatócitos - HGF

Os primeiros estudos realizados para verificar o processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial de dois terços sugeriram que fatores solúveis estimulavam esse processo regenerativo. Em estudos posteriores foi demonstrada a existência de um fator de crescimento no plasma com ação mitogênica, que estimulava o crescimento dos hepatócitos em cultura primária. Foi descoberta, então, a estrutura primária do Fator de Crescimento de Hepatócitos (Hepatocyte growth factor – HGF), que inicialmente recebeu o nome de Hepatopietina A (MICHALOPOULOS; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS, 1992).

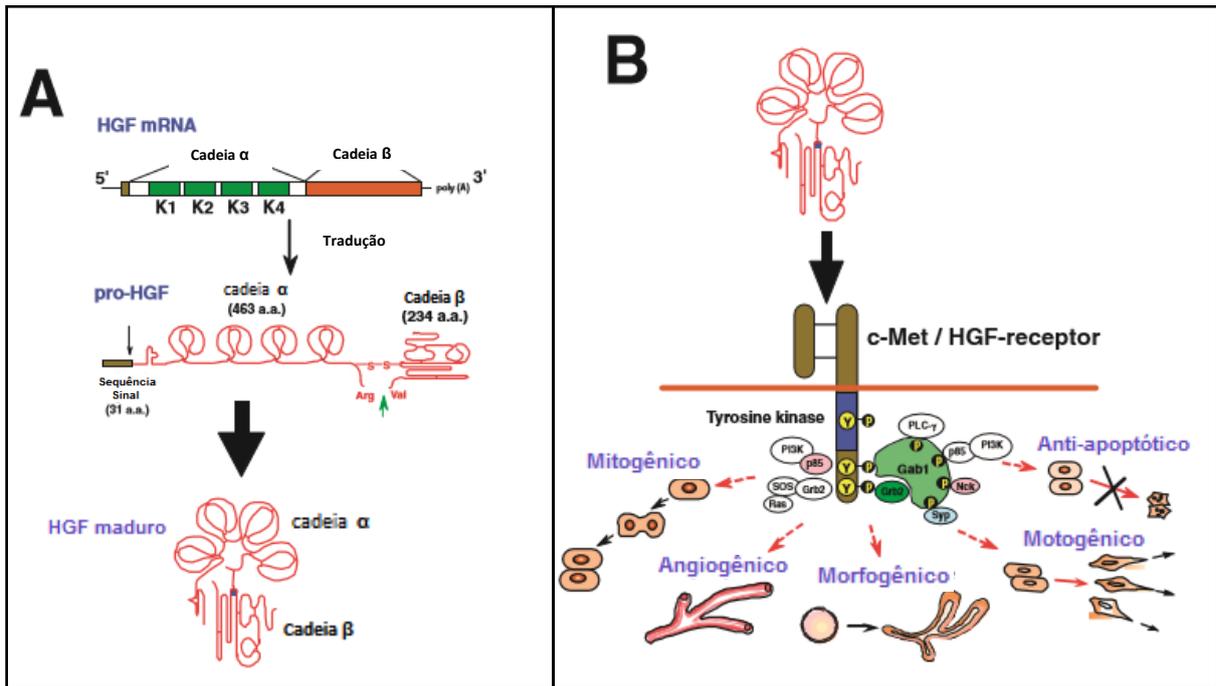
O HGF é uma glicoproteína heterodimérica, composta por 128 aminoácidos, formada por uma cadeia pesada (α) de aproximadamente 64 kDa, com quatro domínios “Kringle” (estrutura com 3 pontes dissulfeto), homóloga ao plasminogênio, e uma cadeia leve (β) de aproximadamente 32 kDa, apresentando homologia com serino-proteases, mas sem apresentar atividade proteolítica por não terem o sítio catalítico; ambas originadas de um peptídeo de cadeia linear com peso molecular em torno de 87 à 92 kDa (FAUSTO; LAIRD; WEBBER, 1995, JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000). O precursor de HGF, pró-HGF, é rapidamente

ativado por proteases - tais como uPA (ativador de plasminogênio do tipo uroquinase). No tecido hepático em processo de regeneração, a tentativa da degradação da matriz extracelular por proteases favorece a ativação do pró-HGF para HGF maduro com consequente síntese de DNA, tanto por mecanismos parácrinos, como autócrinos. Em adultos, a expressão basal de HGF pelos tecidos é importante para homeostase natural, onde a produção de HGF por células mesenquimais locais mantém o epitélio especializado do tecido, como por exemplo nos rins, onde acredita-se que a expressão de HGF pelas células mesangiais no microambiente favoreça a renovação celular normal (MUNGUNSUKH; MCCART; DAY, 2014).

O HGF é produzido por células mesenquimais em diferentes órgãos, mas no fígado é produzido pelas CEHs, células de Kupffer e células endoteliais (MAHER, 1993), atuando, portanto, de maneira parácrina. No fígado intacto, como mencionado, o HGF é secretado pelas CEHs, e a partir do momento em que as células ativam-se, passam a secretar HGF em níveis menores e TGF- β em níveis bastante altos (SKRTIC et al., 1999). Como muitos fatores de crescimento, o HGF tem efeitos pleiotrópicos em vias de sinalização mitogênicas. Seus efeitos são mediados também pela interação com outros fatores de crescimento e citocinas (IGF-1, TGF α , VEGF, EGF), tendo sua secreção influenciada através desta interação (TAUB, 2004, SKRTIC et al., 1999).

Além de seus efeitos mitogênicos, o HGF promove efeitos morfogênicos e mutagênicos, podendo ter efeito protetor ao inibir a replicação de células tumorais como melanomas e carcinomas hepatocelulares *in vitro*, por meio da ativação de seu receptor - um receptor de superfície celular tirosina-quinase transmembrana conhecido como Met - sendo expresso em quase todos os tecidos (Figura 4). Vários estudos comprovaram os efeitos do HGF sobre diferentes tipos celulares e órgãos, sugerindo a presença destes receptores em diversos tecidos (JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000, MATSUMOTO; NAKAMURA, 1994, MICHALOPOULOS; ZARNEGAR; MICHALOPOULOS, 1995). O HGF ainda apresenta funções antifibróticas, angiogênicas, e anti-inflamatórias, atuando como potente fator proliferativo no endotélio vascular, evento crucial na angiogênese (JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000, YASUDA et al., 1999).

Figura 4 - Estrutura e funções biológicas do HGF



Fonte: Adaptado de Nakamura e Mizuno (2010).

Legenda: (A) Síntese de HGF maduro. O HGF é produzido e secretado como pró-HGF por células estromais. O pró-HGF secretado é clivado por proteases nos resíduos Arg⁴⁹⁴ e Val⁴⁹⁵ para síntese de HGF maduro constituído por uma cadeia α onde estão inseridos os domínios kringles (K1-4) e uma cadeia β . (B) Os efeitos biológicos do HGF são mediados pela ligação do HGF maduro ao cMet/HGF-receptor. A ligação desencadeia vias de sinalização decorrentes da fosforilação de resíduos de tirosina. Cada efeito biológico é induzido através do recrutamento de moléculas.

O aumento da expressão de HGF em resposta a lesões teciduais foi relacionado a atividades de reparação *in vivo* (ADAMSON; BAKOWSKA, 1999, KAWAIDA et al., 1994) apresentando funções terapêuticas parácrinas e angiogênicas em condições patológicas em órgãos como pulmão (YANAGITA et al., 1992) e coração (FUNATSU et al., 2002, MIYAGAWA et al., 2002).

No fígado, é reconhecido como fator regenerativo hepático que atua principalmente em resposta a lesões hepáticas. No momento da lesão, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, INF- γ) produzidas pelas células do sistema imune (ex: macrófagos residentes ou infiltrados) atuam regulando positivamente o HGF e consequentemente proliferando os hepatócitos (NAKAMURA; MIZUNO, 2010). Por ser o principal fator de crescimento associado com a proliferação dos hepatócitos, o HGF foi foco de estudos dos seus efeitos na fibrose hepática. Experimentos demonstraram que o HGF é capaz de induzir a diferenciação de células-tronco mesenquimais em hepatócitos tanto *in vitro* (OH et al., 2000) quanto *in vivo* (OYAGI et al., 2006). Em estudos experimentais foi observado que o bloqueio do HGF através de anticorpos neutralizantes ocasionou a inibição da proliferação de hepatócitos no processo de

regeneração hepática após lesão (BURR et al., 1998), evidenciando a importância deste fator na capacidade regenerativa do órgão.

A associação da plasticidade e o potencial imunomodulatório das CTMs com os efeitos benéficos do HGF despertou interesse da comunidade científica. Abordagens da biotecnologia possibilitaram a realização de experimentos utilizando CTMs que superexpressassem o HGF (DUAN et al., 2003), no intuito de potencializar os efeitos benéficos dessa população celular.

Diante do exposto sobre terapia celular, as CTMs e seus efeitos benéficos, a manipulação genética para potencializar tais efeitos e sobre o HGF e suas ações no tecido hepático, a hipótese do trabalho é que a modificação genética de CTMs com a finalidade de superexpressar o HGF potencializará a atividade antifibrogênica e o papel regenerativo das células, funcionando como terapia alternativa para as doenças hepáticas crônicas. Desta forma, o presente trabalho objetiva a geração de uma ferramenta (CTM superexpressando HGF) com efeitos anti-fibrogênicos potencializados para estudos posteriores, e verificar os efeitos das CTMs modificadas na fibrogênese, visando a futura utilização destas células modificadas em terapia celular para hepatopatias crônicas, no intuito de fornecer uma melhora na qualidade de vida dos pacientes com tecido hepático ou órgão comprometido.

3 JUSTIFICATIVA

A descoberta da pluripotencialidade das células-tronco tem aberto novas perspectivas no campo da medicina regenerativa. Estudos experimentais realizados por nosso grupo demonstraram que as células-tronco mononucleares da medula óssea (CMMO) são capazes de migrar para área de lesão e participam da regressão da fibrose hepática. Estudos clínicos de fase I e II já foram realizados em pacientes com diferentes hepatopatias, onde nenhum efeito adverso foi observado e houve melhora das funções hepáticas após infusão celular. O potencial de autorrenovação das células-tronco mesenquimais (CTMs) associado a sua plasticidade genômica em resposta ao microambiente celular, seu poder de fusão com células residentes do órgão e, principalmente, sua capacidade de regenerar o tecido com lesão através da libertação de mediadores imunológicos faz dessa célula uma importante alternativa terapêutica nas doenças hepáticas. Alguns mecanismos envolvidos na melhora hepática após infusão de CTMs vêm sendo descritos, onde essas células demonstram ter importante papel na indução de apoptose das células estreladas hepáticas, que é a principal célula responsável pela síntese de tecido fibroso no fígado. Dessa forma, o presente estudo objetivou superexpressar o fator HGF em células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea de camundongos, a fim de se obter uma ferramenta útil para estudos que venham avaliar seu potencial regenerativo em doenças crônicas do fígado, e avaliar o potencial *in vitro* de CTMs geneticamente modificadas sobre CEHs. Com esses resultados pretendemos estabelecer uma nova linha de pesquisa que inclui a manipulação genética de células-tronco e contribuir para o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica direcionada no tratamento das doenças hepáticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o potencial antifibrogênico de CTMs geneticamente modificadas que superexpressam o Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF).

4.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e estabelecer cultura de CTMs de camundongo;
- b) Obter CTMs geneticamente modificadas para superexpressão do fator HGF;
- c) Avaliar o efeito das CTMs modificadas geneticamente (superexpressando HGF) sobre a ativação de CEHs *in vitro*;
- d) Realizar a caracterização fenotípica e ultraestrutural dos tipos celulares estudados.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 Experimentação animal

Para obtenção e cultivo das CTMs foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, de ambos os sexos, pesando entre 20-23g, com 4-6 semanas de idade, mantidos no biotério de experimentação animal do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE sob condições ideais de temperatura (aproximadamente 23°C) e de luminosidade (ciclos de 12 horas claro/escuro), com água e dieta *ad libitum*. Foram coletados tíbias e fêmures dos animais para obtenção da camada de células mononucleares da medula óssea e fígados para extração do RNA Total e síntese de cDNA.

5.2 Obtenção de Células-Tronco Mesenquimais da Medula óssea (CTMMO)

Para obtenção das CTMMO, as tíbias e fêmures de 5 camundongos da linhagem C57BL/6 foram dissecadas a fim de se retirar todo o tecido conjuntivo adjacente e evitar qualquer tipo de contaminação. Os ossos foram mantidos em meio de cultura Dubelcco MEM (DMEM) – low glucose (Invitrogen-Gibco[®], USA) suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Invitrogen-Gibco[®], USA) e 2% de antibiótico (Penicilina 10.000 U/ml e Estreptomicina 10.000 µg/ml –Gibco- *Life Technologies*, SP, BRA), até a centrifugação da medula em gradiente de Ficoll (Histopaque 1119 e 1077 Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1000 x g por 15 minutos sem refrigeração e sem freio para se obter a camada de células mononucleares da medula óssea (CMMO). A fração enriquecida com CMMO foi coletada, lavada por centrifugação em meio DMEM, 1000 x g por 15 minutos e as células viáveis foram contadas em microscópio óptico com azul de Trypan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Cerca de 10⁶ células foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular T25cm², onde foram mantidas com meio DMEM suplementado com 20% de SBF e 1% de antibióticos, a 37°C com 5% de CO₂. A cada 24 horas as células foram observadas em microscópio óptico invertido a fim de se avaliar a morfologia e a aderência celular. Após 72 horas de cultivo houve a primeira troca de meio com a finalidade de se retirar todas as células não aderentes que poderiam caracterizar outra população celular. O cultivo foi feito até que as células não aderentes fossem totalmente removidas e as células aderentes adquirissem morfologia fibroblastóide (critério de caracterização das CTMs). Foram realizadas trocas de meio a cada 72 horas até as células

atingirem entre 80-90% de confluência, onde foi realizada a primeira passagem celular (repique), utilizando tripsina 0,25% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e EDTA 0,02% (Invitrogen-Gibco[®], USA). A cada passagem, parte das células (10^6) foram criopreservadas utilizando uma solução de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma Aldrich, USA) e 90% de SBF.

5.3 Diferenciação Osteogênica e Adipogênica das CTMMO

Para caracterizar a população de células-tronco mesenquimais, as células na passagem 20 foram semeadas em placas de 24 poços a partir de 2 concentrações diferentes (1×10^5 células e 3×10^5) divididas em dois grupos: grupos de diferenciação e grupo controle. Durante 21 dias, as células do grupo de diferenciação foram cultivadas com meio indutor de diferenciação osteogênica: DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), ascorbato-2-fosfato ($50 \mu\text{M}$), β -glicerofosfato ($10 \mu\text{M}$) e dexametasona ($0,1 \mu\text{M}$) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), ou meio indutor de diferenciação adipogênica: DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), indometacina ($60 \mu\text{M}$), 3-isobutilmetilxantina ($500 \mu\text{M}$), dexametasona ($1 \mu\text{M}$) e insulina ($5 \mu\text{g/ml}$) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), como descrito no protocolo de Secco et al. (2008), com algumas adaptações. O grupo controle foi cultivado com meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de antibiótico. Os meios indutores de diferenciação e DMEM (para o grupo controle) foram trocados a cada 72 horas e as placas observadas a cada 7 dias. Para confirmar a diferenciação osteogênica, ao final dos 21 dias, a placa foi corada pelo método de Von Kossa e para confirmar diferenciação adipogênica a placa foi corada com Oil Red O, e por fim as placas foram avaliadas em microscópio invertido.

5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Aproximadamente 10^7 células foram tripsinizadas, coradas com azul de trypan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), a fim de se verificar a viabilidade celular, e contadas em microscópio de óptico invertido e foram então centrifugadas a $1000 \times g$ durante 10 minutos e lavadas com PBS-Wash (PBS contendo 0,5% de BSA e 1% de azida sódica, pH 7,2). A população de células foi distribuída em alíquotas contendo 1×10^6 células em tubos de citometria de poliestireno. Posteriormente, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos à 4°C e ao abrigo da

luz específicos para os marcadores de superfície: Rat- anti-mouse CD34, CD45 (marcação negativa), CD105, CD73, CD44, Sca-1 e CD29 (marcação positiva) (BD Pharmigen, EUA) de camundongo, seguindo as orientações do fabricante. Ao fim do experimento, as células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo (*FACS Calibur – Becton Dickson Immunocytometry Systems*).

Quadro 1- Anticorpos e fluorocromos conjugados utilizados na citometria

Anticorpos	Fluorocromos
CD 29	FITC
Ly6A – Sca-1	
CD 105	
CD 14	
CD 45	APC
CD 73	
CD 34	PE
CD 44	

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para isolamento do gene *Hgf*, a extração de RNA total foi feita a partir de tecido hepático pesando aproximadamente 100mg, o qual foi imediatamente congelado em 300µl de Trizol (Invitrogen ®) após retirada do animal. Posteriormente, o órgão foi macerado com auxílio de pistilos. O reagente utilizado para extração, Trizol (Invitrogen ®), foi acrescentado à amostra de tecido macerada e homogênea para completar volume final de 1 ml. Para a separação do RNA dos demais componentes celulares, foram adicionados 200 µl de clorofórmio, seguido de homogeneização vigorosa por aproximadamente 15 segundos e centrifugação à 12.000 x g, por 15 minutos à 15°C. A fase translúcida e aquosa (fase contendo o RNA) foi retirada e precipitada com 500 µl de álcool isopropílico. Posteriormente foram acrescentados mais 500 µl de etanol 75%, a amostra foi centrifugada à 12.000 x g por 10 minutos à 15°C e ressuspensa em água ultrapura livre de nucleases (Invitrogen).

A integridade do RNA foi avaliada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain. A concentração do RNA, bem como seu grau

de pureza foram quantificados utilizando o aparelho NanoDrop 2000, disponibilizado pelo Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM – FIOCRUZ. Posteriormente, 3µg de RNA foram utilizadas para a síntese de cDNA (DNA complementar) através do *kit GoTaq® 2-Step RT qPCR System* (Promega), segundo as orientações do fabricante para reações utilizando oligo dTs.

5.6 Clonagem

5.6.1 Desenho de oligonucleotídeos

A sequência de nucleotídeos codificante do gene *Hgf*, bem como a sequência de aminoácidos foram analisadas utilizando a base dados disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology information*) (Número de acesso da sequência: D10212.1). Através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do *Hgf* de humano (*H. Sapiens*) e camundongo (*M. Musculus*) foram alinhadas, a fim de se observar a existência de similaridade entre as duas sequências. Uma vez confirmada a similaridade entre as sequências, para a realização da clonagem, foram desenhados *primers forward* e *reverse*, para amplificação da sequência codificadora do fator HGF, bem como primers internos para sequenciamento com auxílio da ferramenta *primer designing tool* do NCBI. (Quadro 2).

Quadro 2- Sequência de *primers* desenhados para amplificação e sequenciamento do gene *Hgf*.

<i>Primer</i>	Sequência 5'-3'
HGF Forward	CCTGGATCCCATGATGTGGGGACCAAAC
HGF Reverse	GAGGCGGCCGCGTCAACTTGTATGTCAAATTAC
HGF_Seq Forward	CAGAATCAGGCAAGACTTGTC
HGF_Seq Reverse	CGCCTCTTCATGAACATCGTG

Fonte: Elaborado pelo autor.

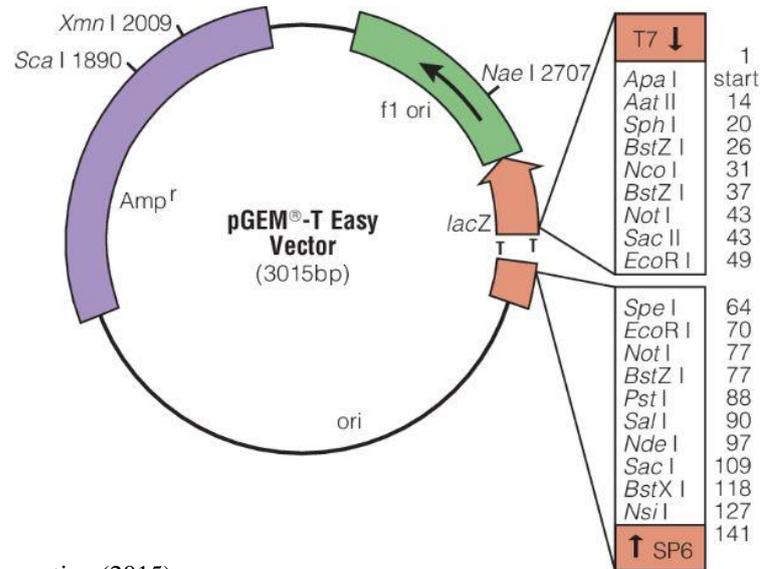
5.6.2 Amplificação do gene *Hgf*

Para amplificação do gene *Hgf* foram utilizados 0,2 µl da enzima AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (5 U/µL) (Invitrogen®), 2 µl do Primer HGF forward (100µM), 2 µl do Primer HGF reverse (100µM), 5 µl do tampão 10X AccuPrime™ PCR Buffer, 100ng de cDNA e a quantidade suficiente de água deionizada para completar 50 µl de reação. Em seguida a reação de PCR foi submetida as seguintes condições de ciclagem: 95° - 2min seguido de 35 ciclos: 95° – 1 min, 55° 30 seg, 72°- 30 seg; e extensão final: 72°C – 5 min. Após a reação de PCR, os amplicons foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com 10 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain. Após a corrida eletroforética o gel foi analisado através de transiluminador UV para visualização das bandas de DNA e fotografado com auxílio do programa e fotodocumentador LPIX image (Loccus Biotecnologia).

5.6.3 Clonagem em pGEM –T-Easy

Com o objetivo de obter uma maior quantidade de inserto (*Hgf*) para realizar a subclonagem no plasmídeo de expressão (pCMV-LacZ), após a corrida eletroforética a banda correspondente ao produto da amplificação do HGF foi excisada do gel de agarose com auxílio de lâmina estéril, foi purificada através do kit Illustra™ *GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare) segundo as instruções do fabricante e quantificada no NanoDrop 2000. O gene purificado foi ligado ao vetor de clonagem pGEM®-T-Easy (Promega) (Figura 6). A reação de ligação foi realizada na proporção de aproximadamente 1:3 (vetor: inserto), na qual foram utilizados 0,5 µl da enzima T4 DNA ligase (3U/µl), 5µl do tampão 2X Rapid Ligation Buffer, 50 ng do vetor de clonagem pGEM-T-Easy, 135 ng do gene amplificado HGF e a quantidade suficiente de água deionizada para completar 10 µl de reação, a reação foi incubada overnight à 4°C.

Figura 5- Representação esquemática do vetor de clonagem pGEM –T-Easy.



Fonte: Promega Corporation (2015)

Legenda: Representação do vetor pGEM –T-Easy apontando as principais características envolvidas no processo de clonagem, como: resistência ao antibiótico ampicilina, local de origem de replicação, sítio de clonagem múltipla (sítios para enzimas de restrição específicas), timidinas (T) livres nas regiões de clonagem e tamanho do vetor.

Após a reação, os produtos da ligação foram transformados em bactérias quimiocompetentes TOP 10 (*E. coli*). A transformação foi realizada com 5ul da ligação pGEM-T-Easy_HGF e 50ul de células quimiocompetentes, por choque térmico (30 minutos no gelo e 5 minutos à 37°C) e plaqueadas em meio LB (Luria Bertani) com ampicilina (100 µl/ml) IPTG (1M) e X-GAL (50mg/mL) deixadas a 37°C, por 18h.

Para análise dos clones positivos, 5 colônias isoladas, de coloração branca, foram inoculadas em 5 ml de meio LB com ampicilina (50 µg/µl) deixadas sob agitação (150 RPM) a 37°C, por 18h. A extração do DNA plasmidial foi realizada através de minipreparação por lise alcalina. As extrações foram fracionadas em gel de agarose a 0,8% corado com 10 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain e fotografadas usando o fotodocumentador e programa LPIX image (Loccus Biotecnologia). Para confirmação inicial da clonagem, foi realizada uma reação de digestão em pequena escala (volume final 10µl) com a enzima EcoRI HF® (20.000 u/ml) (New England Biolabs Inc. - NEB®) e o tampão CuttSmart® Buffer (New England Biolabs Inc. - NEB®). A reação foi incubada à 37°C por 2h.

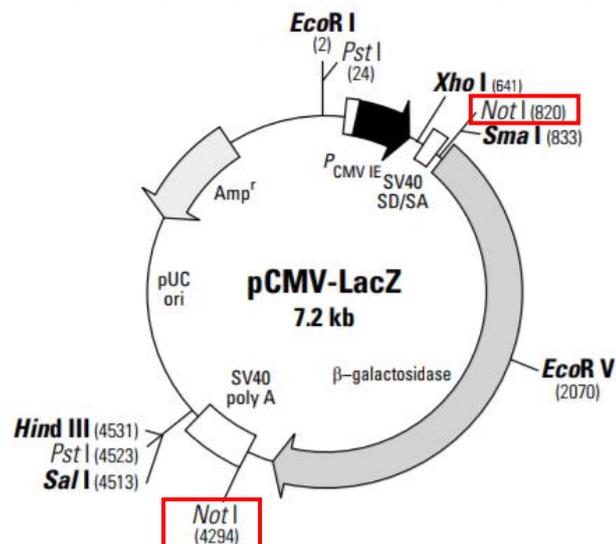
Para confirmação das sequências de nucleotídeos dos insertos dentro do vetor de clonagem, os 5 clones extraídos da construção pGEM-T-Easy_HGF foram sequenciados. Foram utilizados iniciadores para sequenciamento (descritos no Quadro 3), além de iniciadores específicos para o pGEMT easy (M13 Forward e Reverse), todos a uma concentração final de 3,2 pmol. As amostras nas concentrações recomendadas para a reação de sequenciamento (100 ng/ul) foram encaminhadas ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM – FIOCRUZ e

os plasmídeos foram sequenciados utilizando sequenciador capilar automático ABI 3500. As sequências geradas foram editadas no software EditSeq e os eletroferogramas, resultantes do alinhamento das sequências, foram analisados com auxílio do software SeqMan do pacote DNASTAR (Lasergene). As sequências alinhadas foram comparadas com a sequência referente ao HGF obtida através da base dados disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology information*) (Número de acesso da sequência: D10212.1).

5.6.4 Subclonagem no vetor pCMV-LacZ

No intuito de gerar um DNA recombinante para transfecção e expressão em CTMs, o gene *Hgf* foi subclonado no plasmídeo pCMV-LacZ (β gal) (Clontech Laboratories, Inc.) (Figura 7). Este vetor é apropriado para expressão em células eucarióticas, contendo em sua sequência a região codificante para o gene da β galactosidase que pode servir para monitorar a eficiência da transfecção ou ser excisada através dos sítios de Not-I para inserção e expressão de outro gene no plasmídeo. Nesse plasmídeo, a expressão do gene é controlada pelo forte promotor do Citomegalovírus Humano (CMV), ativo constitutivamente em células de mamíferos.

Figura 6 - Representação esquemática do vetor de expressão pCMV-LacZ.



Fonte: Clontech Laboratories, Inc. (2012)

Legenda: Representação do vetor pCMV- LacZ apontando os principais elementos no plasmídeo envolvidos no processo de clonagem e expressão, tais como: resistência ao antibiótico ampicilina, local de origem de replicação, promotor de células eucarióticas CMV, sítio de clonagem múltipla (sítios para enzimas de restrição específicas) com os sítios para Not I, utilizados para subclonagem, onde houve a inserção do gene *hgf*, destacados em vermelho, região codificante para o gene da β galactosidase, PolyA – região de poliadenilação que serve como sinal de parada da tradução, entre outros elementos.

Após confirmação das sequências através de sequenciamento, um clone positivo da clonagem pGEM-T-Easy_HGF foi submetido à reação de digestão em larga escala (volume final 50 µl) para separação do vetor (pGEM-T-Easy) e inserto (*Hgf*). A reação ocorreu com aproximadamente 1 µg do DNA, 1,5 µl da enzima Not I - HF® (10.000 u/ml) em tampão CuttSmart® Buffer 1x (New England Biolabs Inc. - NEB®) 2 horas à 37°C. O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1% para excisão da banda referente ao gene *hgf*. Paralelamente, o plasmídeo de expressão pCMV-LacZ também foi digerido com a enzima Not I em condições semelhantes e submetido a tratamento com a enzima Antarctic Phosphatase (5.000u/ml) e o tampão *IX Antarctic Phosphatase Reaction Buffer* (New England Biolabs Inc. - NEB®) durante 2 horas à 37°C.

O produto do tratamento do pCMV-LacZ e a banda do gel contendo o gene *Hgf* foram purificados com o kit Illustra™ *GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare) e posteriormente foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase (3U/µl) e o tampão 10x Buffer T4 DNA Ligase (New England Biolabs Inc. - NEB®) à 16°C, *overnight*. As ligações foram realizadas nas razões molares inserto: vetor de 1:1 e de 3:1 e uma reação sem o inserto serviu como controle da subclonagem. Em seguida, as ligações foram transformadas em bactérias quimiocompetentes, seguido da extração de DNA plasmidial, como descrito no item 5.6.3. Para confirmação da presença do inserto e do vetor no DNA os DNAs plasmidiais extraídos foram submetidos a duas reações de digestão independentes com as enzimas EcoRI - HF® (20,000 u/ml) e Not I - HF® (10.000 u/ml) em tampão CuttSmart® Buffer (New England Biolabs Inc. - NEB®) por 1 hora à 37°C, para confirmação da subclonagem do gene na orientação correta para expressão, a qual também foi confirmada por sequenciamento de maneira semelhante à metodologia descrita no item 5.6.3.

5.7 Transfecção das CTMs

Com o objetivo de internalizar a construção pCMV_HGF nas CTMs, foi realizada a transfecção do plasmídeo recombinante com a utilização do reagente lipossômico Lipofectamine 3000 (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante. Duas soluções com 125 µl de Opti-MEM (Gibco) foram preparadas, onde na primeira foram adicionados 2,5 µg do DNA do plasmídeo recombinante e 5 µl do reagente P3000 (Invitrogen®), e na segunda, 7,5 µl de Lipofectamine 3000. As soluções foram misturadas e incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, para formação do complexo DNA-lipossoma. 250 µl das soluções misturadas e incubadas foram adicionados à aproximadamente 6×10^5 células plaqueadas

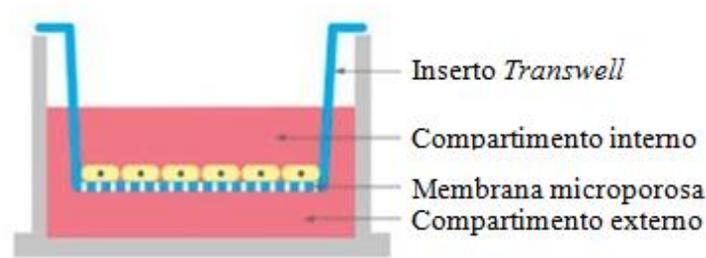
previamente em placa de 6 poços e mantidas até atingirem 70% de confluência. Como controle do experimento foram utilizadas células transfectadas com o plasmídeo pCMV_LacZ original, células transfectadas apenas com os reagentes, porém sem DNA e células não transfectadas.

5.8 Co-cultivo de CTMs modificadas com CEHs

Para avaliar os efeitos parácrinos exercidos entre as populações celulares: CTM modificadas e células estreladas hepáticas (CEHs - componente principal da fibrogênese hepática) foi realizado um sistema de co-cultivo indireto. Para tal, as CEHs da linhagem imortalizada GRX (originadas de camundongos esquistossomóticos), obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas com meio Dubelcco MEM – low glucose (Invitrogen-Gibco[®], USA) suplementado com 10% de SBF (Invitrogen-Gibco[®], USA São Paulo, BRA.) e 1% de antibiótico (Penicilina 10.000 U/ml e Streptomicina 10.000 µg/ml –Gibco- Life Technologies, SP, BRA), mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ e repicadas com Tripsina 0,25% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e EDTA 0.02% (Invitrogen-Gibco[®], USA). As CTMs, mantidas nas mesmas condições, foram transfectadas seguindo a metodologia descrita no item 6.7 para obtenção da linhagem superexpressando HGF (CTM_HGF).

Para realização do co-cultivo indireto foram utilizadas placas contendo inserto de policarbonato semipermeável (Transwell[®], Corning, membrana de policarbonato com poro de 0,4µm) (Figura 8). Cerca de 10⁵ células estreladas (GRX) na passagem 4 foram plaqueadas no compartimento superior da placa (Transwell) e as CTM_HGF (48h após transfecção) ou CTMs (sem modificação - na passagem 27), foram cultivadas no compartimento inferior, numa proporção de 1:1 (GRX:CTM), em DMEM contendo SBF a 10% e 1% de penicilina/estreptomicina (protocolo adaptado de PAREKKADAN et al., 2007a). Como controle das células transfectadas com Lipofectamine, foram utilizadas as células GRX co-cultivadas com CTMs transfectadas de maneira similar com plasmídeo original (CTM_pCMV) e como controle negativo do experimento, foram utilizadas células estreladas da linhagem GRX cultivadas individualmente. O co-cultivo foi mantido por 48 horas e após esse tempo, todas as células foram coletadas para análise dos níveis de expressão de SMA-α, marcador de ativação das CEHs e de HGF (nas células modificadas para a superexpressão de HGF). Os sobrenadantes do co-cultivo também foram coletados para dosagem de citocinas por citometria de fluxo e ELISA. Todos os co-cultivos foram realizados em triplicatas.

Figura 7 - Representação esquemática do co-cultivo indireto.



Fonte: Tradução de Corning Inc. (2007)

Legenda: Ilustração demonstrativa do experimento de co-cultivo indireto. As células plaqueadas no compartimento interno (GRX) interagem com as células presentes no compartimento externo (CTMs) através da membrana microporosa presente no inserto *Transwell* e pela manutenção em meio de cultura comum às populações celulares.

5.9 Análise da expressão de *Hgf*

A expressão de *Hgf* foi analisada em dois tempos: 48 horas após a transfecção (antes do co-cultivo) e 96 horas após a transfecção (após o co-cultivo). As células transfectadas cuja expressão foi analisada antes do co-cultivo (48 horas após a transfecção) foram retiradas dos poços através de tripsinização, a expressão de *Hgf* foi verificada nas células transfectadas com pCMV_HGF e nas células controle (CTM_pCMV – transfectadas com o pCMV original, CTM – não transfectadas, C- - transfectadas sem DNA). As células transfectadas cuja expressão foi avaliada depois do co-cultivo (96 horas após a transfecção) também foram tripsinizadas e a expressão do HGF foi verificada nas células transfectadas com pCMV_HGF e nas células controle (CTM_pCMV).

A extração de RNA e síntese de cDNA foi realizado como descrito anteriormente. De forma preliminar, a expressão do mRNA do *Hgf*, foi analisada por reação de RT-PCR convencional, usando 500ng de cDNA do *Hgf* foram amplificados com 0,2 µl de Taq DNA polymerase (Invitrogen®) (5U/µl), 1µl dos primers HGF_qPCR_Forward e HGF_qPCR_Reverse (100 µM), 2µl PCR Buffer10x, 0,4 µl de dNTPs10mM, 0,6 µl de MgCl₂ 50 mM e água em quantidade suficiente para volume final de 20 µl. A reação de PCR foi submetida as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial: 95° - 5min ; seguida de 35 ciclos: 95° – 1 min, 55° 1min,72°- 1min; e extensão final: 72°C – 7 min. Após a reação de PCR, os amplicons foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com 10 µl de SYBR® Safe DNA Gel Stain. Para todas as reações a expressão do gene da β-actina foi utilizada como controle endógeno.

5.10 RTqPCR

Para avaliar os níveis de expressão de α - actina de músculo liso (α -SMA - marcador da fibrogênese hepática) foram realizadas reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), a partir do cDNA das amostras. Para tal, 5 μ g de RNA de cada amostra foram utilizados para sintetizar cDNA através do *kit GoTaq® 2-Step RT qPCR System* (Promega) e tratados com DNase I. As reações de qPCR foram realizadas com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e primers específicos detalhados no quadro 2. A expressão relativa de α -SMA foi calculada por meio do método $\Delta\Delta$ CT no Software Applied Biosystems RQ, no ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), tendo a expressão do gene da β -actina como controle endógeno.

Quadro 3- Sequência de *primers* utilizados na qPCR, *primers* desenhados para β -actina (controle endógeno) e α -SMA

Primer	Sequência 5'-3'
β actina - Forward	CCGTAAGACCTCTATGCCA
β actina - Reverse	AGGAGCCAGAGCAGCAAT
α -SMA- Forward	TCAGGGGAGTAATGGTTGGA
α -SMA – Reverse	GGTGATGATGCCGTGTTTC

Fonte: Elaborado pelo autor

5.11 Ensaios Imunológicos

5.11.1 ELISA

A dosagem da citocina pró-inflamatória TGF- β 1 (fator de crescimento transformação-beta 1) a partir do sobrenadante coletado 48 horas após o co-cultivo foi realizada através da técnica de ELISA sanduíche (Human/mouse TGF-beta1, e-Bioscience, San Diego, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da densidade óptica foi determinada por leitor de microplacas (modelo 3550, Thermo Scientific), lida em um comprimento de onda de 450 nm e a concentração da citocina foi calculada em pg/mL.

5.11.2 CBA

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A, IL-6, TNF, INF- γ e IL-10 presentes no sobrenadante coletado 48 horas após o co-cultivo celular foi realizada através da técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA) através do kit Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD, Pharmingen, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Na técnica, 25 μ L das beads de captura marcadas com anticorpos foram transferidos para tubos destinados às amostras a serem testadas e ao controle negativo. 25 μ L das amostras de sobrenadante e do diluente foram adicionados aos seus respectivos tubos, 25 μ L das beads de captura e do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas de camundongo marcados com PE foram adicionados aos tubos e incubados por 2 horas ao abrigo da luz. Após a incubação, os tubos foram lavados com 1 mL de solução de lavagem e centrifugados a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 μ L de solução de lavagem para ressuspensão das amostras e posterior leitura. Os dados foram obtidos no citômetro de fluxo FACS Calibur e analisados de acordo com o padrão de migração e posicionamento de cada citocina.

5.12 Análise ultraestrutural

Para fazer uma análise ultraestrutural e comparativa das populações celulares (GRX e CTM sem modificação) utilizadas no estudo, foram realizadas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

5.12.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Aproximadamente 10^5 células de cada linhagem (GRX e CTM) foram semeadas em lamínulas estéreis de 13mm dentro de uma placa de 24 poços com meio DMEM (acrescido de 10% de FBS e 1% de antibiótico) e mantidas à 37°C em estufa de CO₂ até atingirem pré-confluência (70%). Em seguida, as células sobre as lamínulas foram fixadas por 1 hora em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato durante 15 minutos. As células foram lavadas em tampão fosfato, pH 7,2. A etapa de desidratação foi realizada através de lavagens em série crescente de etanol (7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%). O ponto crítico, feito para retirada de água do tecido, foi realizado na câmara de ponto crítico (CPD - *Critical Point Dryer*) por aproximadamente 1 hora. O material seco foi montado em “*Stubs*” com auxílio de fita dupla

face de carbono e metalizado com fina camada de ouro por meio de um sistema de evaporação (*Sputtering*). As amostras montadas e metalizadas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM5600 LV.

5.12.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os dois tipos celulares (GRX e CTM) foram cultivados nas mesmas condições (garrafa T 25cm², 37°C e 5% CO₂ em meio DMEM + 10% FBS e 1% antibiótico) até atingirem 90% de confluência. As células foram lavadas em DMEM livre de soro e antibiótico e tampão fosfato, pH 7,2, fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 1 hora. A pós-fixação foi realizada com solução de Tetróxido de Ósmio 1% e Ferrocianeto de Potássio 1,6% (proporção de 1:1) por 40 minutos. Foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos em tampão fosfato. A desidratação foi feita por lavagens em uma série crescente de acetona (70%, 90% e 100%). Após a desidratação foi realizada a infiltração em resina EPON 812 para posterior emblocamento em estufa de 60°C. As amostras foram cortadas em ultramicrotomo. Os cortes com espessuras de 60-70 nm foram contrastados e analisados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM – FIOCRUZ em Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI, Tecnai G2 Spirit.

5.13 Análise da ativação das CEHs da linhagem GRX

Para analisar o estado de ativação das células estreladas da linhagem GRX, foram realizadas técnicas moleculares (*Western blot* e RT-qPCR) de detecção do marcador fibrogênico α -SMA. Como controles positivos foram utilizadas as CTMs, que expressam α -SMA em altos níveis.

As células GRX e CTM foram mantidas em cultivo em ambiente condicionado como descrito previamente, até atingir confluência. Aproximadamente 2×10^5 células foram lisadas em tampão desnaturante (2-mercaptoetanol) e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE a 15%. Após a corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com solução de leite em concentração de 5% diluído em TBS Tween 1x, durante 1 hora e incubada *overnight* com anticorpo primário anti- α -SMA (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:1000. Após a incubação, a membrana foi lavada 3x com TBS Tween 1x e incubada com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Jackson Immunoresearch), na concentração de 1:5000 por 1 hora. Então, a membrana foi incubada com

solução contendo peróxido de hidrogênio 0,03%, luminol 1,2 mM e iodofenol 0,4 mM por cerca de 2 minutos, sob proteção da luz, e colocada em contato com o filme fotográfico. O filme foi revelado utilizando solução de dektol (Kodak, NY), ácido acético glacial e água corrente.

Para avaliar a expressão de α -SMA após tratamento com estímulos pró-inflamatórios, aproximadamente 10^5 células GRX foram plaqueadas em placa de cultura de 6 poços (Corning, USA). Após 48h de cultivo padrão, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas com meio DMEM acrescido de LPS nas concentrações de 100ng/ml e 500 ng/ml ou TGF- β 1 recombinante, na concentração de 1ng/ml, e mantidas por 24h e 48h. As células foram tripsinizadas e submetidas à lise com tampão desnaturante para a corrida em gel SDS-PAGE para realização de *Western blot* como descrito previamente.

A expressão relativa do mRNA de α -SMA foi avaliada por RT-qPCR nas células da linhagem GRX e como controle positivo foram utilizadas as CTMs. A extração do RNA das células foi feita por Trizol e a integridade do RNA verificada em gel de agarose 2%, 5 μ g de RNA foram usados para a síntese de cDNA, a RT-qPCR foi realizada seguindo a metodologia do item 5.10.

5.14 Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram expressos em medianas. Com base no teste de normalidade, as diferenças foram avaliadas através de análises não-paramétricas pelo teste KruskalWallis, com pós-hoc de Dunn. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, USA). O valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.15 Considerações Éticas

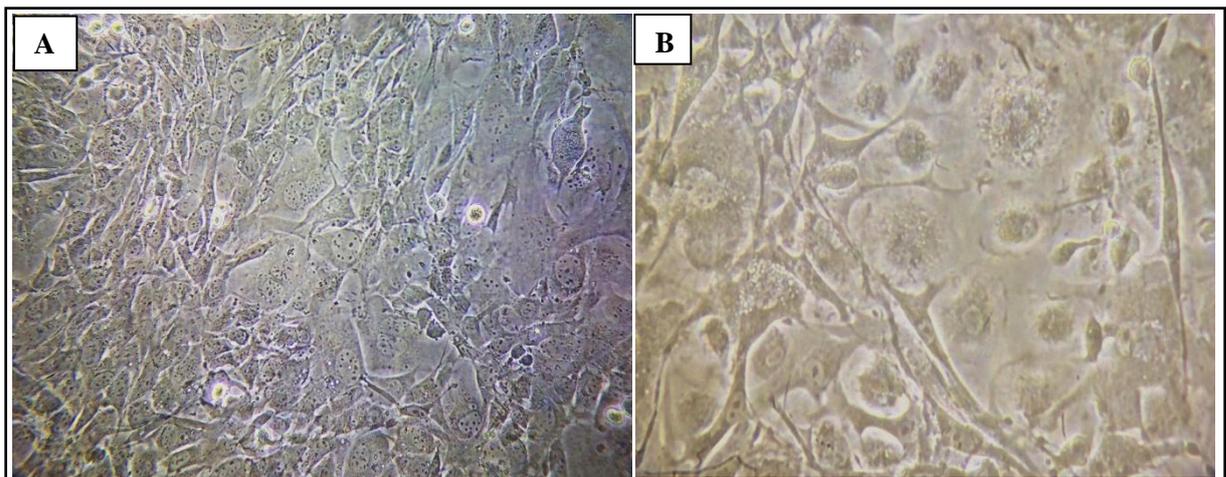
Os experimentos com animais no presente trabalho estão de acordo com as normas éticas estabelecidas na FIOCRUZ e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) 108/2016 (Anexo A).

6 RESULTADOS

6.1 Isolamento e cultivo das CTMs

As CTMs obtidas por gradiente de ficoll e mantidas em ambiente condicionado (5% CO₂ e temperatura de 37°C) iniciaram a aderência nas primeiras 24 horas. Células com morfologia fibroblastóide foram inicialmente observadas após 72 horas. As células não aderentes foram removidas durante a troca do meio após 72h de cultivo. Em aproximadamente dez dias de cultivo, as CTMs atingiram 90% de confluência, aspectos demonstrados pela análise morfológica e observação diária em microscópio óptico invertido (Figura 8)

Figura 8- Cultivo de células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea de camundongos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

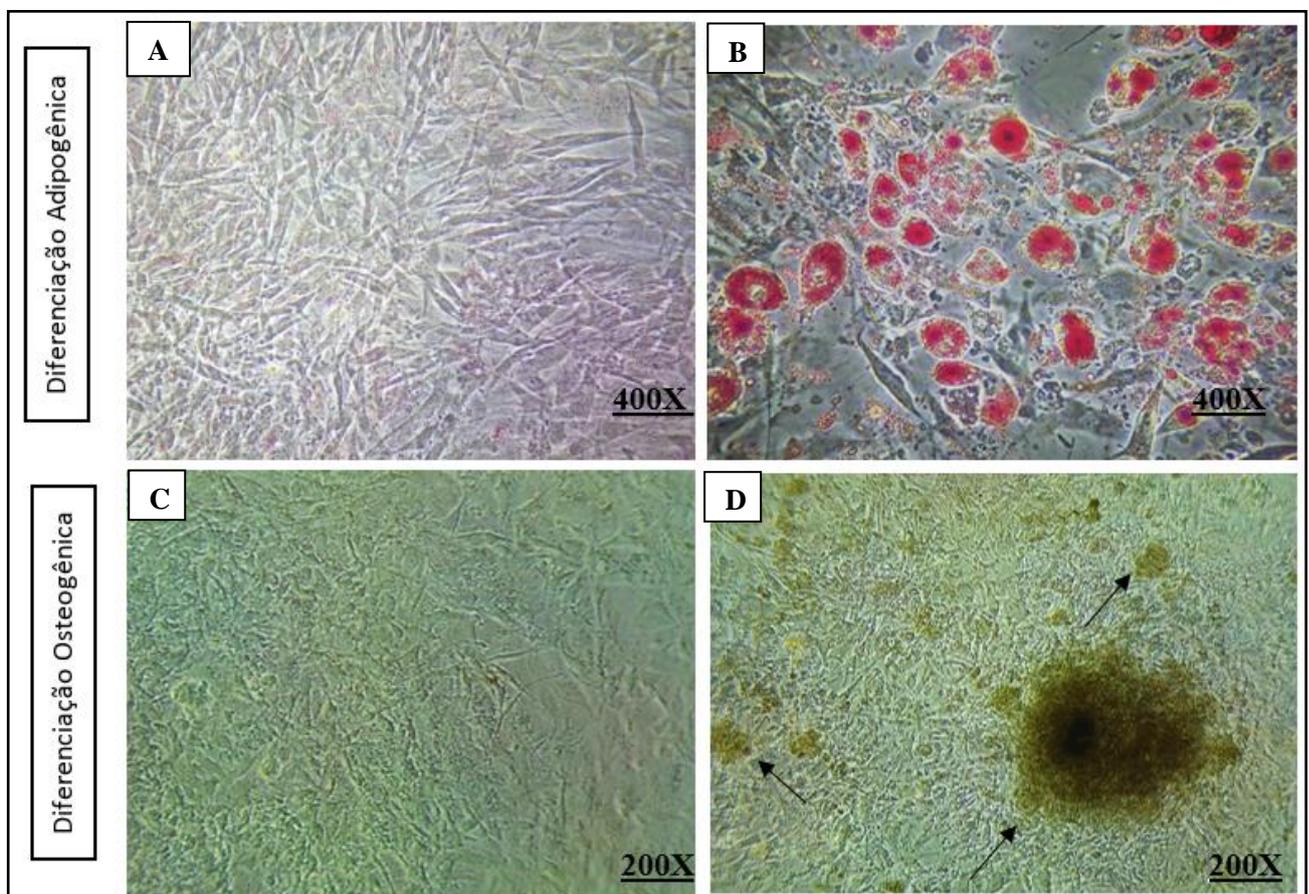
Legenda: (A) Células confluentes, com uma semana de cultivo, apresentando morfologia fibroblastóide, aspecto alongado, aderentes à superfície de plástico observadas em um aumento de 200x em microscópio óptico invertido. (B) Células do mesmo cultivo em um maior aumento, 400x, evidenciando a morfologia celular.

6.2 Potencial de diferenciação celular

As CTMs foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos quando cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e osteogênica, respectivamente. Com 15 dias de cultivo, as células da placa de diferenciação adipogênica já apresentavam morfologia alterada, contendo gotículas de lipídios em seu interior, diferente das células nos poços controle que apresentavam morfologia idêntica à do início do cultivo (fibroblastóide) (figura 9 A). O processo de diferenciação foi confirmado no 21º dia de cultivo, quando as gotículas lipídicas presentes no interior das células adquiriram coloração vermelha após coloração com Oil Red O

(Figura 9 B). Na placa de diferenciação osteogênica, com 10 dias de cultivo, pequenas estruturas de coloração escurecida agrupadas (indicativo de depósitos de matriz mineral) encontravam-se presentes nos poços das células que foram cultivadas com meio indutor de diferenciação, enquanto nos poços controles não foram observadas essas estruturas e as células permaneceram com morfologia fibroblastóide (Figura 9 C). O processo de diferenciação foi confirmado no 21º dia de cultivo quando os depósitos de matriz mineral foram evidenciados pela coloração de Von Kossa (Figura 9 D).

Figura 9- Células-tronco mesenquimais diferenciadas e coradas.



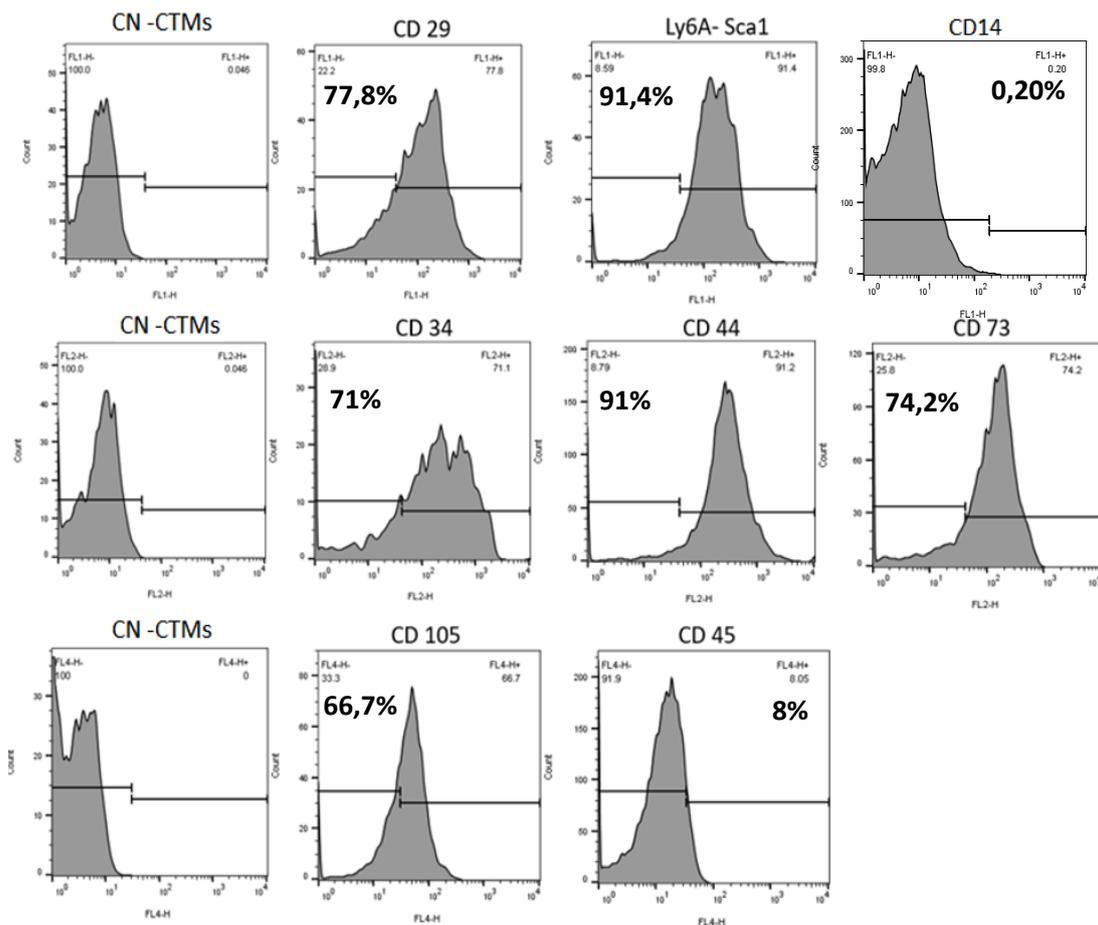
Fonte:Elaborada pelo autor

Legenda: (A) Células controle cultivadas sem meio indutor de diferenciação coradas com Oil Red O. (B) Gotículas lipídicas no interior das células coradas em vermelho após a indução diferenciação adipogênica e coloração com Oil Red O. (C) Células controle cultivadas sem meio indutor de diferenciação coradas pelo método de Von Kossa.(D) Depósitos matriz mineral (setas) corados pelo método de Von Kossa após a indução da diferenciação osteogênica. Diferenciação das células confirmada após 21 dias de cultivo.

6.3 Caracterização imunofenotípica das CTMs

As CTMs obtidas de camundongo C57BL/6, na décima passagem do cultivo celular, foram avaliadas quanto ao perfil de expressão de moléculas de superfície celular considerado característico de CTMs através de citometria de fluxo. Para o painel de anticorpos utilizados, as células apresentaram marcação positiva para os antígenos de superfície: CD29 (77,8%), CD34 (71%), CD 44 (91%), CD 105 (66,7%), Sca-1 (91,4%) e com percentuais abaixo de 10%, sendo assim considera das negativas para: CD45 (8%). As células sem nenhum tipo de marcação, utilizadas como controles negativos, serviram como parâmetro de análise para expressão positiva ou não dos marcadores a depender do fluorocromo utilizado, avaliados de acordo com o deslocamento do histograma.

Figura 10- Imunofenotipagem para os marcadores de superfície das Células-Tronco mesenquimais da medula óssea.



F

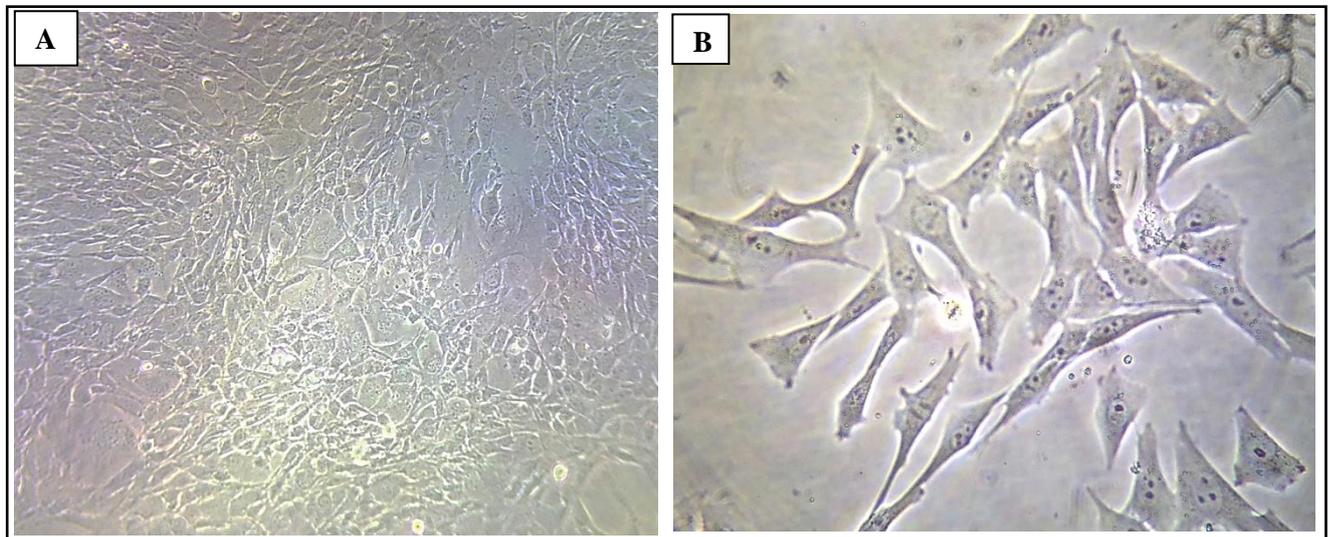
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Marcação com anticorpos para antígenos de superfície das Células-Tronco Mesenquimais por citometria de fluxo. O fluxograma CN- CTMs representa células sem marcação utilizadas com padrão negativo para avaliar a expressão. Histogramas de cada marcador apresentando a porcentagem de células positivas de acordo com o canal de leitura do fluorocromo.

6.4 Cultivo de células da linhagem GRX

As células estreladas hepáticas da linhagem GRX foram cultivadas para experimentos de co-cultivo indireto com CTMs e de avaliação ultraestrutural. No cultivo em condições padrão (5% de CO₂ e temperatura de 37°C), as células apresentaram morfologia alongada e irregular, com projeções citoplasmáticas evidentes, núcleos bem delimitados e aderência à superfície de plástico com 24 horas de cultivo (Figura 11 A e B). As células apresentaram alta taxa de proliferação após os 5 primeiros dias de cultivo.

Figura 11- Cultivo de células estreladas hepáticas da linhagem GRX.



Fonte:Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Células GRX na passagem 5, apresentando 90% de confluência observadas em um aumento de 200x em microscópio óptico invertido. (B) Células GRX na 4ª passagem, no 4º dia de cultivo, ainda entrando em confluência (aproximadamente 50%), observadas em aumento de 400x evidenciando a morfologia celular alongada com núcleo delimitado e aparente em cada célula.

6.5 Clonagem do gene *Hgf*

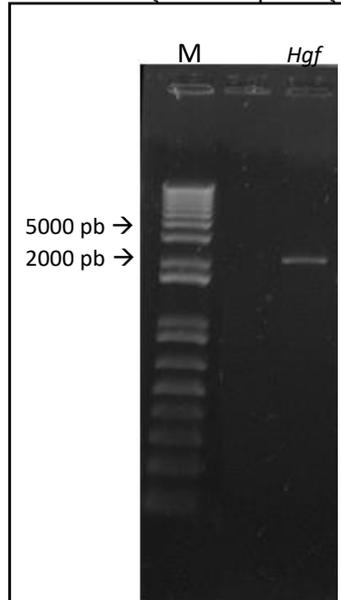
6.5.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A avaliação do RNA total extraído dos fígados de camundongo foi feita inicialmente por corrida eletroforética em gel de agarose 1% (dados não mostrados), o nível de pureza da amostra foi quantificado, a razão DO_{260nm} / DO_{280nm} (densidade óptica) permaneceu entre os valores aceitáveis para ácidos nucleicos puros (1.8 – 2), sugerindo a pureza do componente extraído. O cDNA sintetizado após a extração do RNA total foi quantificado e a concentração foi de: 1769,9 ng/μl.

6.5.2 Amplificação do gene *Hgf*

Após a reação de amplificação, o produto da PCR para o gene *Hgf* foi fracionado em gel de agarose 1% (Figura 12). O fragmento correspondente foi amplificado no tamanho esperado, onde no gel foi possível identificar a banda correspondente (~2204 pb).

Figura 12- Confirmação da amplificação do gene *Hgf*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

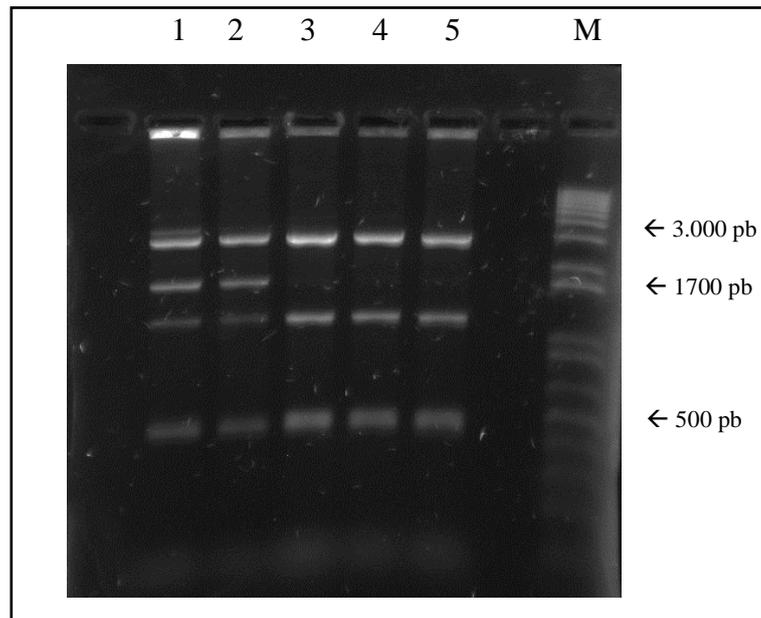
Legenda: A amplificação do gene *Hgf* confirmada por corrida eletroforética, na qual o fragmento de banda apresentou o tamanho correspondente ao gene de interesse quando comparado com o marcador 1 kb Plus Ladder (M).

6.5.3 Clonagem em pGEM-T-Easy

Como resultado da transformação em bactérias quimiocompetentes do produto da reação de ligação do inserto *Hgf* no vetor pGEM-T-Easy, foram observadas 280 colônias, das quais 173 eram colônias brancas – potencialmente positivas.

Os plasmídeos extraídos de 5 colônias brancas foram submetidos à reação de digestão para confirmação da clonagem e inserção do *Hgf* no vetor pGEM-T-Easy com a enzima *EcoRI*, que possui sítios de reconhecimento tanto no vetor quanto no inserto. As digestões fracionadas em gel de agarose 0,8% apresentaram um padrão de bandas esperado, confirmando a presença do constructo pGEM-T-Easy_HGF nas colônias extraídas (Figura 13).

Figura 13- Análise por restrição da construção pGEM-T-Easy_HGF.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: As digestões dos plasmídeos extraídos (poços 1-5) fracionados em gel de agarose 1% apresentou um padrão de bandas característico do vetor pGEM (3015 pb) e evidenciou a existência de sítios internos de restrição compatíveis com a enzima utilizada, liberando fragmentos menores, correspondentes ao inserto digerido internamente (460 pb, 510 pb, 1210 pb) quando comparadas ao marcador 1 kb Plus Ladder (M). As amostras 1 e 2 apresentaram na banda de 1720 pb, referente à digestão parcial da enzima EcoRI.

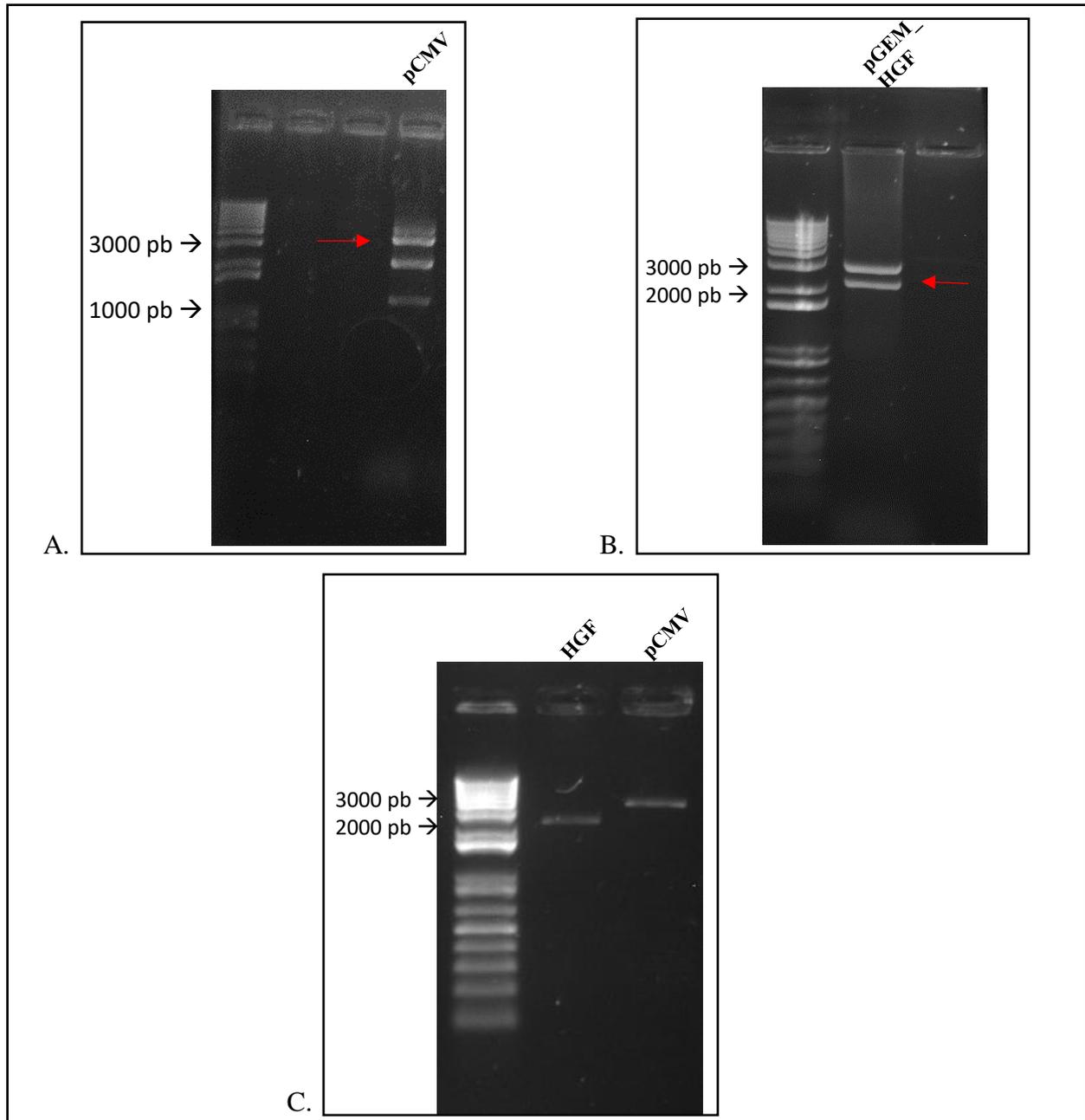
Os 5 clones da construção pGEM-T-Easy_HGF extraídos das colônias positivas foram também sequenciados a fim de se verificar a integridade das sequências de nucleotídeos correspondentes ao vetor e ao inserto. A análise dos eletroferogramas das 5 extrações realizadas e sequenciadas demonstrou que 4 delas apresentaram mutações em alguns nucleotídeos, porém a sequência que permaneceu íntegra, segundo sequenciamento, foi utilizada nos experimentos subsequentes.

6.5.4 Subclonagem em pCMV-LacZ

O DNA plasmidial extraído contendo o vetor pCMV-LacZ foi digerido com as enzimas *Not I* e *EcoRV*, a fim de se liberar a região codificante da β galactosidase e deixar extremidades livres complementares às extremidades do inserto HGF para realização da subclonagem (Figura 14 A). Paralelamente, o DNA contendo o *Hgf* foi submetido à uma reação de digestão com a enzima *NotI* para separação do vetor de clonagem pGEM-T-Easy e subclonagem no vetor pCMV-LacZ. Os produtos da digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (Figura 4B), onde foram observadas as bandas correspondentes ao vetor e ao inserto de

interesse, as quais foram purificadas separadamente para dar início à reação de ligação (Figura 14C).

Figura 14- Digestão do gene *Hgf*, digestão do pCMV-LacZ e purificação do inserto e vetor.



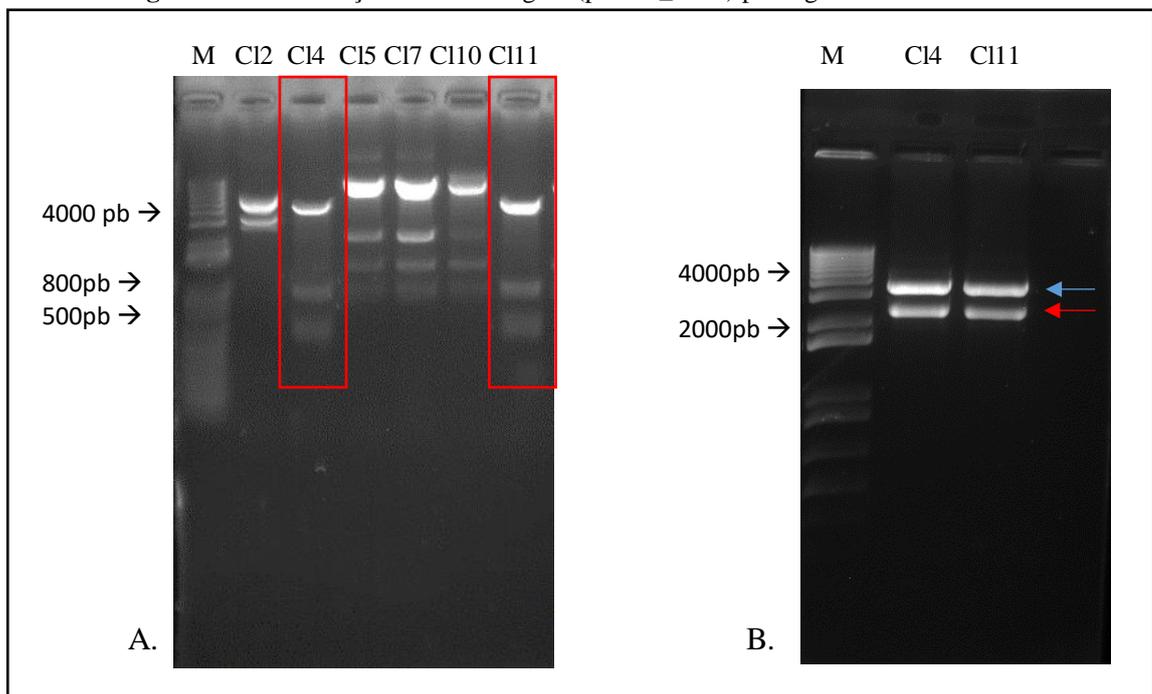
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Etapas sequenciais da subclonagem do gene *hgf* no vetor pCMV. (A) plasmídeo pCMV-LacZ digerido com as enzimas NotI e EcoRV e fracionado em gel de agarose 1%. A banda correspondente ao plasmídeo (~3.7 kb) foi evidenciada após a corrida eletroforética (Seta vermelha). (B) Construção pGEM-T-Easy_HGF digerida com a enzima Not I e fracionada em gel de agarose 1%. O padrão das bandas confirmou a separação do vetor pGEM (3015pb) e do inserto *Hgf* (2204 pb) (seta vermelha). (C) Fragmentos do gene *Hgf* (~2204 pb) e do plasmídeo pCMV-LacZ (~3700 pb) purificados e fracionados em gel de agarose à 1%. Marcador 1 Kb Plus Ladder.

Como resultado da ligação pCMV_HGF foram observadas 11 colônias na placa da ligação na proporção 1:3 (vetor:inserto), 6 colônias na placa da ligação de proporção 1:1 e 3

colônias no controle negativo (sem inserto). Após a extração plasmidial foram selecionados 6 clones com tamanhos aproximados ao da construção pCMV_HGF (~5900 pb). O DNA plasmidial desses clones foi extraído e a subclonagem na orientação correta foi confirmada por digestão enzimática com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, onde, para dois clones (C14 e C111) foram visualizadas o padrão de bandas esperado (Figura 15) de maneira similar à digestão simulada *in silico* nos softwares *Gene Construction Kit - GCK®* e *ApE (A plasmid Editor V. 2.0.51)*.

Figura 15- Confirmação da subclonagem (pCMV_HGF) por digestão analítica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Digestão confirmatória da subclonagem do *Hgf* no vetor pCMV. **(A)** Clones submetidos à digestão com a enzima EcoRI, quando fracionados em gel de agarose à 1%. Dois clones (destacados em vermelho) apresentaram o padrão de bandas esperado e visualizado na clonagem *in silico* (~4089 pb, 827 pb, 512 pb e 482 pb). **(B)** Clones positivos (4 e 11) submetidos à digestão com a enzima Not I. O fracionamento em gel de agarose à 1% demonstrou a separação do vetor e do inserto através do padrão de bandas apresentado pCMV – 3700 pb (seta azul) e *Hgf* – 2204 pb (seta vermelha).

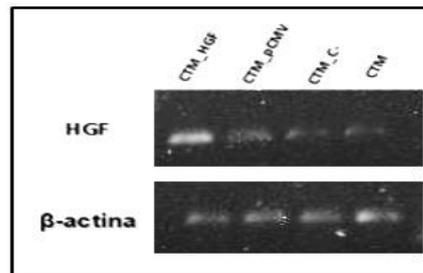
Por fim, os clones positivos foram analisados por sequenciamento a fim de se verificar a integridade das sequências de nucleotídeos correspondentes ao vetor de expressão e ao inserto. A sequência consenso obtida a partir da análise dos eletroferogramas dos dois clones (4 e 11) foi submetida à uma análise comparativa através da ferramenta Blastx, disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology information*). Todas as sequências geradas a partir do sequenciamento das clonagens que apresentavam o padrão de bandas adequado, alinharam entre si e com a sequência de referência publicada e disponível no banco de dados (*genebank*:

D10212.1) e indicaram que a sequência inserida no plasmídeo (pCMV) apresentava 99% de identidade com a sequência disponível do *Hgf* de *Mus musculus*. Apesar da similaridade constatamos a presença de 2 mutações em 2 bases nucleotídicas.

6.6 Transfecção e avaliação da expressão do *Hgf*

A análise qualitativa nas CTMs transfectadas com pCMV_HGF feita por RT-PCR convencional demonstrou que, após 48 horas de transfecção, a expressão do *Hgf* se mostrou aparentemente mais elevada quando comparada com as células controle (transfectadas com pCMV_LacZ, apenas com os reagentes (sem DNA) e as células não transfectadas), indicando um possível aumento da expressão de *Hgf* além dos níveis basais expressos pelas células controle (Figura 16).

Figura 16- Análise qualitativa da expressão de *Hgf* nas CTMs 48 horas após a transfecção.

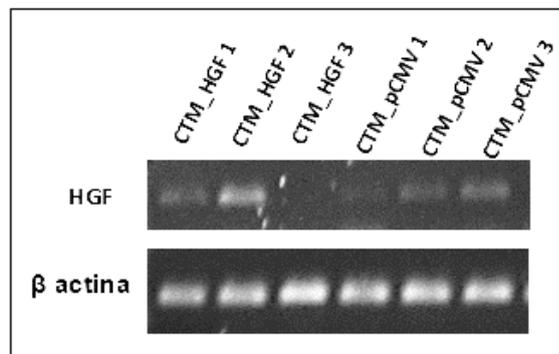


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A análise qualitativa da expressão do transcrito *Hgf*, após 48 horas da transfecção com a construção pCMV_ *Hgf*. A imagem demonstra a banda correspondente ao fragmento do *Hgf* das CTMs transfectadas com a construção, pCMV_HGF (CTM_HGF) em comparação àquelas amplificadas a partir dos controles negativos utilizados (CTM, CTM + reagentes da transfecção (C-) e CTM transfectada com o plasmídeo vazio (CTM_pCMV). A amplificação do gene constitutivo β -actina, foi usada para fins comparativos.

A expressão do *Hgf* também foi avaliada 48 horas após o co-cultivo, totalizando 96 horas após a transfecção. A análise qualitativa da expressão demonstrou que a expressão do *Hgf* não se manteve constante, pois a expressão do gene se mostrou variável nas triplicatas (Figura 17).

Figura 17- Análise qualitativa da expressão de *Hgf* nas CTMs 96 horas após a transfecção (48 horas após o co-cultivo).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A análise qualitativa da expressão do mRNA de *hgf*, após 48 horas do co-cultivo das células modificadas com a construção pCMV_HGF. A imagem demonstra as bandas correspondente ao *hgf* nas triplicatas das CTMs transfectadas com construção pCMV_HGF (CTM_HGF) pós-co-cultivo em comparação àquelas transfectadas com o plasmídeo vazio (CTM_pCMV) utilizadas como controle. A amplificação do gene constitutivo β -actina, foi usada para fins comparativos.

6.7 Co-cultivo de CTM e de CEHs da linhagem GRX

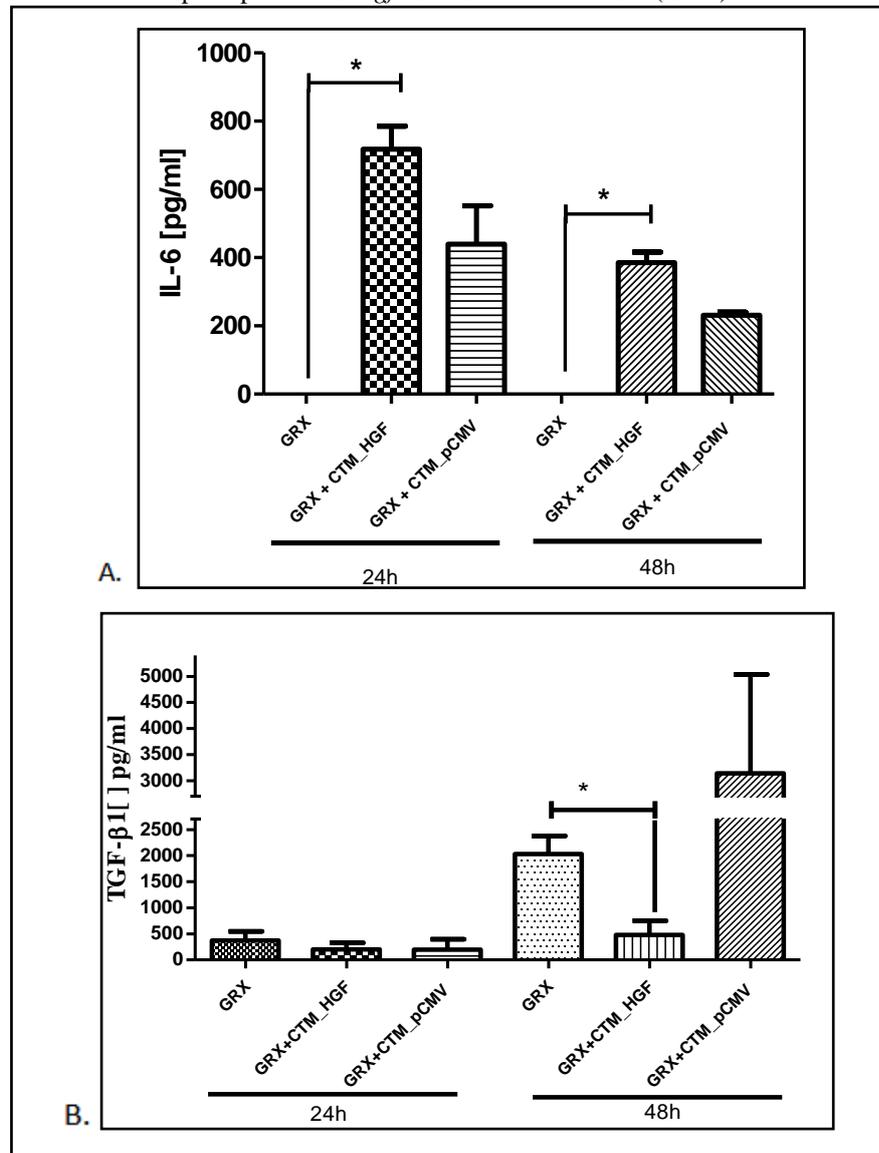
Para avaliar se as CTMs modificadas para superexpressão de *Hgf* causaria algum efeito parácrino na secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e na expressão de marcador da fibrogênese hepática pelas células GRXs, foi estabelecido o co-cultivo indireto entre estas células e avaliada a secreção de citocinas e expressão de α -SMA.

6.7.1 Dosagem de citocinas

As citocinas IL-2, IL-4, IL-17A, IL-6, TNF, INF- γ , e IL-10 foram quantificadas por CBA (citometria de fluxo) e o fator TGF- β 1, por ELISA sanduíche. Todas as dosagens foram realizadas com os sobrenadantes coletados 24 e 48 horas após o co-cultivo. De todas as citocinas dosadas por CBA, apenas a IL-6 apresentou concentração acima do limiar de detecção do *kit*. Todas as outras citocinas apresentaram concentração abaixo do limiar de detecção e assim, não foi possível determinar sua quantificação. A dosagem de IL-6 demonstra que quando as CTMs modificadas são co-cultivadas com as células GRXs, a citocina aumenta significativamente em comparação à GRX cultivada sozinha, entretanto é possível perceber que em 48 horas a quantidade de IL-6 secretada foi menor que nas primeiras 24 horas (Figura 18 A). A dosagem de TGF- β 1 demonstra que em 24 horas a dosagem de TGF- β 1 foi baixa em todas as condições, porém, nas análises de 48 horas é possível perceber níveis mais elevados de TGF β 1, com uma

redução significativa no sobrenadante co-cultivo de GRX + CTM_HGF em comparação à GRX em cultivo basal (Figura 18 B).

Figura 18- Dosagem dos níveis de IL-6 e TGF- β 1 nas células GRX 24 e 48 horas após co-cultivo de CTMs superexpressando *Hgf* com Células estreladas (GRX).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Gráficos demonstrando as dosagens de IL-6 e TGF- β 1 realizadas com sobrenadante coletado 24 e 48 horas após o co-cultivo. (A) Aumento significativo da concentração de IL-6 no sobrenadante das CTM modificadas co-cultivadas com GRX 24 horas após o co-cultivo e o mesmo resultado observado 48 horas após o co-cultivo. (B) Uma redução significativa de TGF β 1 foi observada no sobrenadante das células GRX co-cultivadas com CTM_HGF. **GRX** – Linhagem de célula estrelada em cultivo basal; **GRX + CTM_HGF** – Células-tronco mesenquimais modificadas superexpressão de HGF co-cultivadas com células estreladas da linhagem GRX.; **GRX + CTM_pCMV** - Células-tronco mesenquimais controle transfectadas com o plasmídeo vazio, co-cultivadas com células estreladas da linhagem GRX (*= $P < 0.05$).

6.7.2 Quantificação do marcador α -SMA

A análise da expressão relativa dos níveis de α -SMA das células da linhagem GRX co-cultivadas com CTM modificadas, feita por RT-qPCR, não demonstrou alterações nos níveis de expressão do marcador em relação às células GRXs em cultivo basal. A expressão de α -SMA não foi detectada (dados não mostrados) em nenhuma das células GRXs cultivadas nas diferentes condições (submetidas a cultivo basal sozinhas ou co-cultivadas com CTMs modificadas e controles), podendo ser um indicativo que este marcador está presente em níveis muito baixos neste tipo celular, visto que o controle endógeno (β -actina) foi amplificado em todas as amostras analisadas.

6.8 Caracterização ultraestrutural das CTMs e CEHs da linhagem GRX

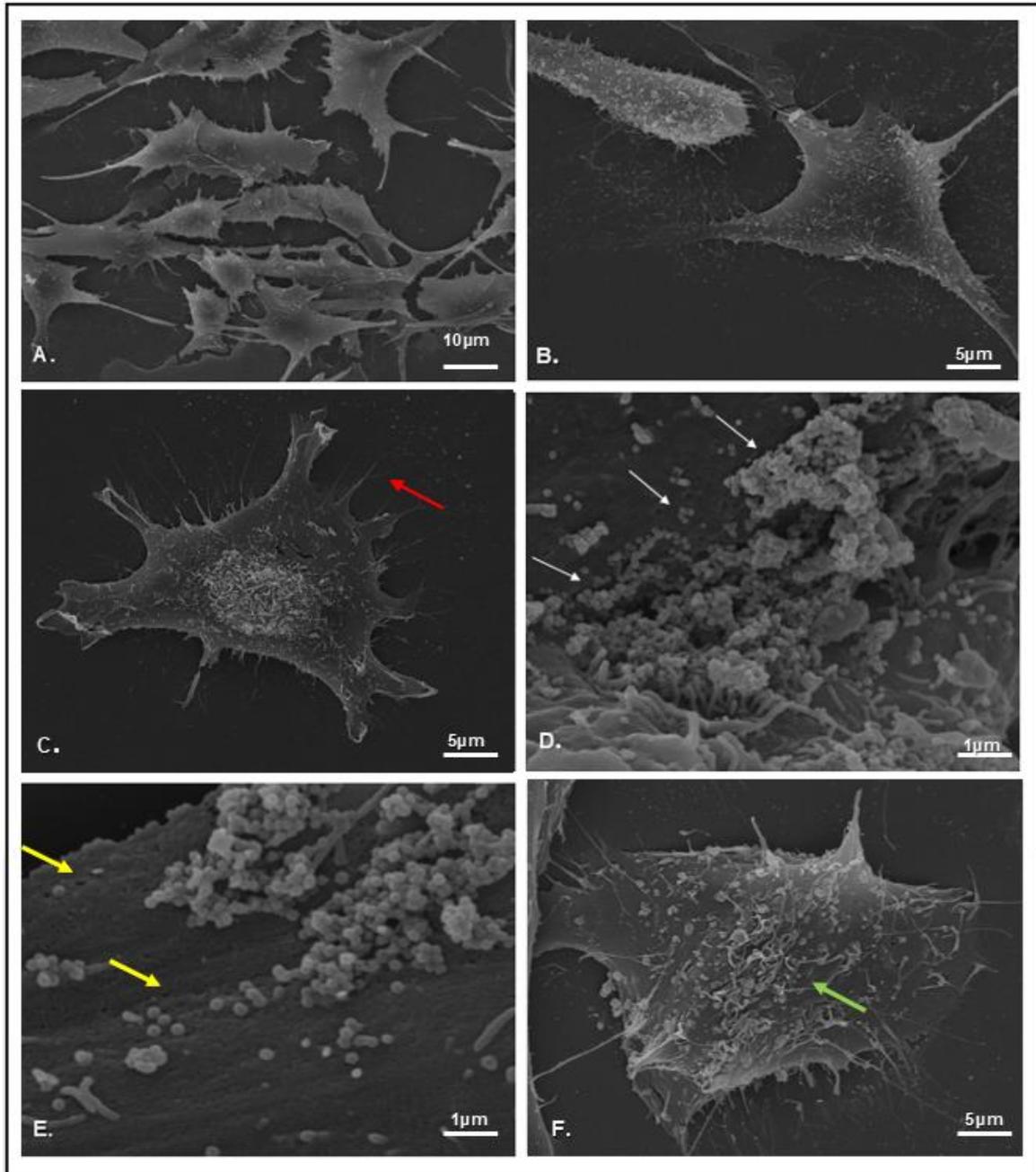
6.8.1 GRXs

Nas análises ultraestruturais das células da linhagem GRX, na passagem seis, por MEV, foi possível observar a morfologia fibroblastóide e “estrelada” apresentada por estas células, com projeções citoplasmáticas proeminentes (Figura 19 A e B), presença de um grande número de vilosidades emergindo da superfície das células (Figura 19 C seta vermelha), *ruffles* de membrana (Figura 19 F, seta verde), partículas de formato arredondado, abundantes e brotando da superfície celular medindo aproximadamente 90-100nm, (Figura 19 D setas brancas) formando pequenas cavidades (cavéolas) (Figura 19 E setas amarelas).

Através das análises realizadas por MET das células GRX foi possível observar células com citoplasma irregular, núcleo grande e irregular contendo nucléolos bem evidentes em seu interior e regiões bastante eletrodensas contendo heterocromatina (Figura 20 A (N) e B (Nu)), organelas citoplasmáticas de síntese proteica bem desenvolvidas como: retículos endoplasmáticos rugosos bem desenvolvidos com cisternas visíveis (Figura 20 A e B (Rer)), microvilosidades partindo na membrana celular (Figura 20 A e B), região perinuclear rica em aparelho de Golgi (Figura 20 E (CG)), grande quantidade de ribossomos (não visíveis nas fotos mas presentes na superfície do retículo endoplasmático rugoso). Além disso foram observadas mitocôndrias com cristas bem definidas (Figura 20 E (M)), vesículas autofágicas (Figura 20 D (Ves)), figuras mielínicas com tamanho regular no citoplasma aparentemente formadas por partes da membrana (Figura 20 C e E (FM)). Um achado bastante interessante foi a identificação de uma grande quantidade de pequenas estruturas com aspectos virais: esféricas de tamanhos

regulares, contendo parede celular brotando da superfície das células incorporando parte da membrana (Figura 20 C, D (PV) e F).

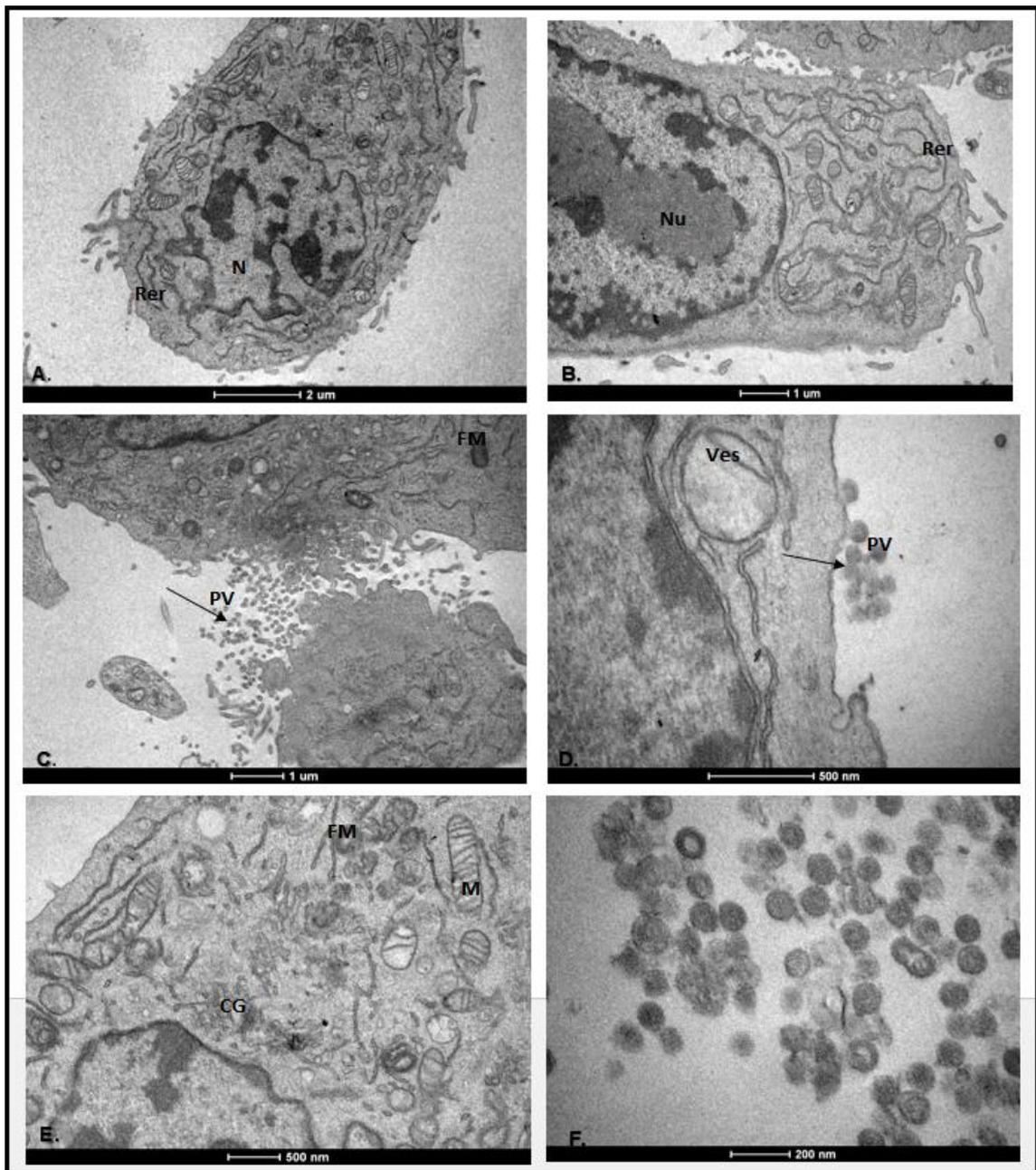
Figura 19- Caracterização ultraestrutural das células GRX por Microscopia Eletrônica de Varredura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Células estreladas da linhagem GRX analisadas por microscopia eletrônica de varredura. As células se apresentaram dispostas com projeções citoplasmáticas proeminentes (A) e (B), vilosidades em excesso foram observadas (C - setas vermelhas), *ruffles* de membrana (F - seta verde), partículas virais brotando da superfície celular (D - setas brancas) formando pequenas cavidades (E - setas amarelas).

Figura 20- Caracterização ultraestrutural das células GRX por Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: células estreladas hepáticas da linhagem GRX analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. As células apresentaram núcleo grande e irregular, (N), retículos endoplasmáticos rugosos bem desenvolvidos (Rer), região perinuclear rica em Aparelho de Golgi (CG), mitocôndrias com cristas bem definidas (M), vesículas autofágicas (Ves), figuras mielínicas (FM) e partículas virais (PV).

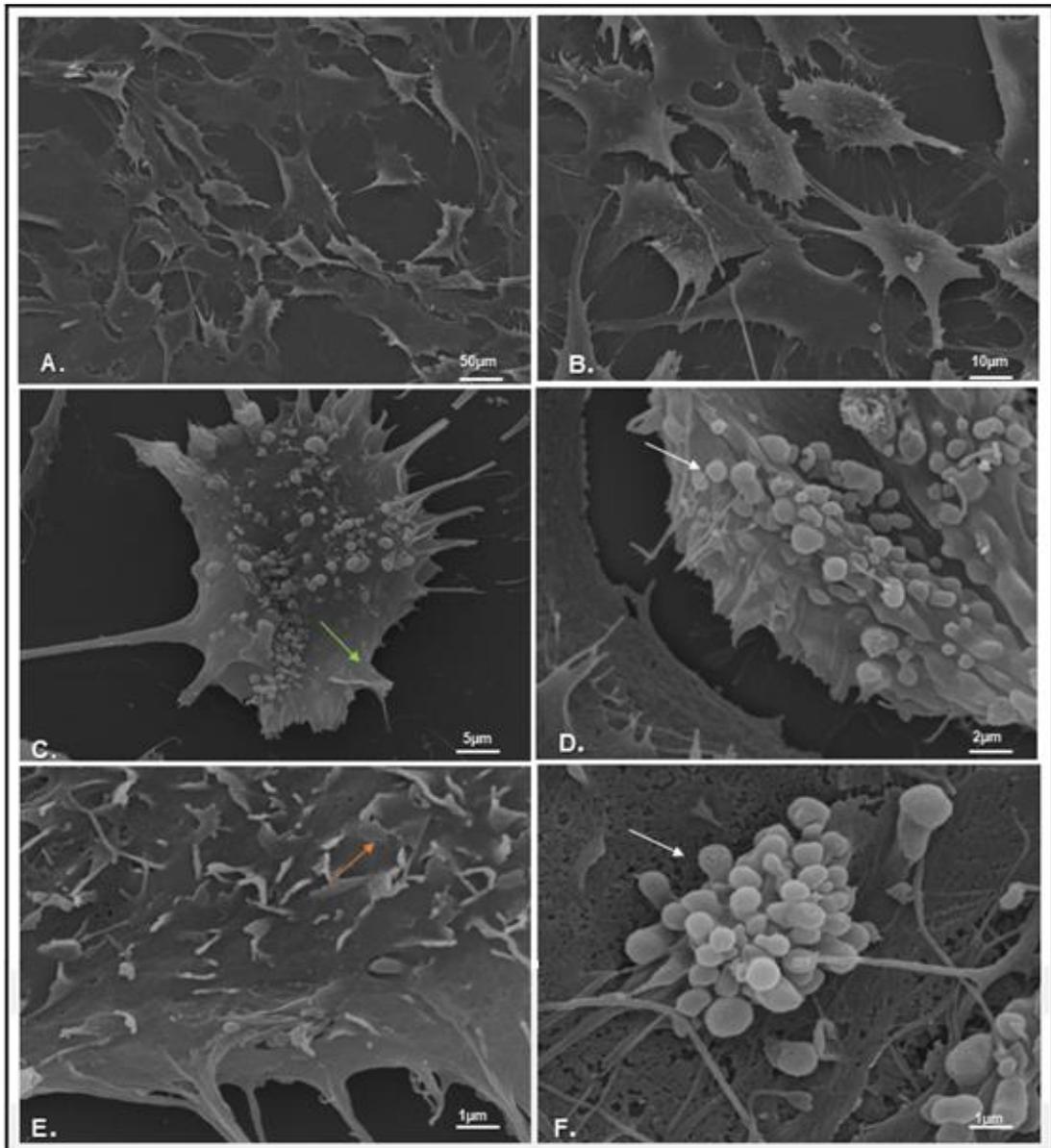
6.8.2 CTMs

Na avaliação das CTMs por MEV foi possível observar e constatar a morfologia fibroblástóide com projeções citoplasmáticas e proeminentes interagindo com as células adjacentes (Figura 21 A e B), com bastante vilosidades citoplasmáticas (Figura 21 C – seta

verde), *ruffles* de membrana (Figura 21 E – seta laranja) Num maior aumento (16000 x), foram observadas também estruturas esféricas de tamanhos irregulares e em grandes quantidades emergindo da membrana citoplasmática das células (Figura 21 D e F – setas brancas).

Na caracterização da CTM feita por MET, as células continham no seu interior citoplasma irregular rico em retículo endoplasmático rugoso, com cisternas bem delimitadas (Figura 22 A (Rer)) e uma grande quantidade de mitocôndrias de formas e tamanhos variados bem desenvolvidas e com cristas notáveis (Fig 22 A, C e D (M)). Foram identificados também corpos multivestibulares (Figura 22 D (CM)). Também, foi possível visualizar vesícula extracelular brotando da superfície da célula (Figura 22 B (VE)). Os núcleos (Figura 22 A, C e D (N)) são formados por estruturas heterogêneas contendo áreas eletrondensas com uma grande quantidade de heterocromatina formada irregularmente como aglomerados na periferia nuclear e presença de nucléolo (Fig, 22 C (Nu)).

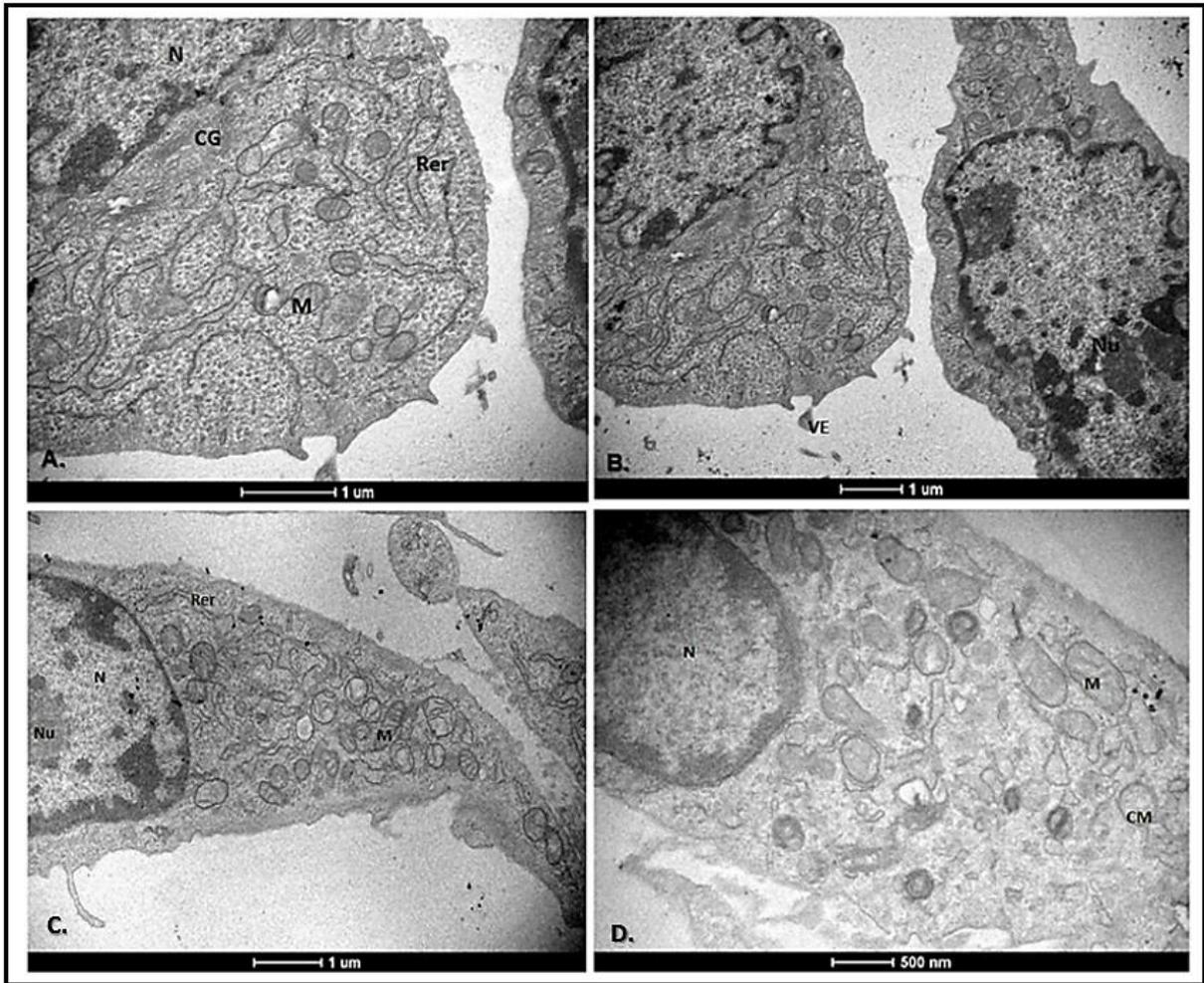
Figura 21-Caracterização ultraestrutural das CTMs por Microscopia Eletrônica de Varredura .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: CTMs analisadas por microscopia eletrônica de varredura. As células se apresentaram dispostas com projeções citoplasmáticas proeminentes, vilosidades citoplasmáticas (C – seta verde), *rufles* de membrana (E – seta laranja) e estruturas esféricas de tamanhos irregulares em grandes quantidades (D e F– setas brancas).

Figura 22- Caracterização ultraestrutural das células CTM por Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: CTMs analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. As células se apresentaram dispostas com projeções citoplasmáticas proeminentes (C), núcleo grande e irregular, (N), retículos endoplasmáticos rugosos bem desenvolvidos (Rer), mitocôndrias com cristas bem definidas (M), vesícula extracelular brotando da superfície da célula (VE).

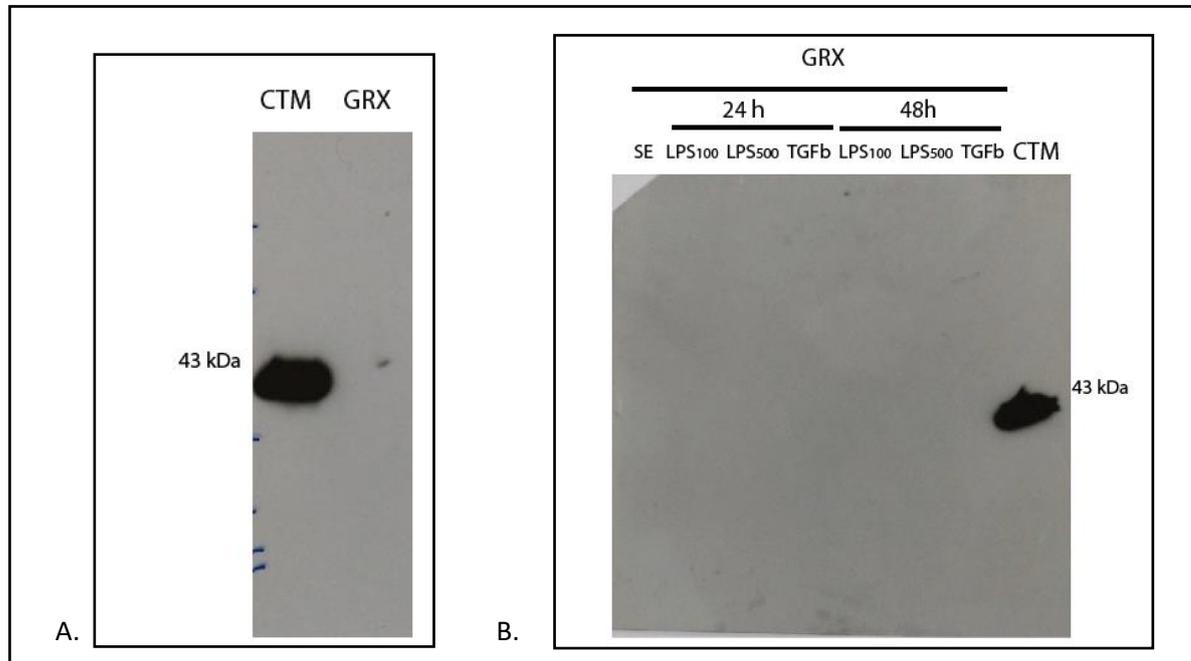
6.9 Análise molecular da ativação das células GRX

6.9.1 Análise de expressão de α -SMA por *Western blot*

Através da análise por *Western blot* não foi possível detectar a expressão de α -SMA nas células GRX mantidas sob cultivo, entretanto, nas CTMs (utilizadas como controle positivo) foi possível observar a banda correspondente à proteína (Figura 25A), indicando que as CTMs utilizadas expressam níveis aumentados de α -SMA, quando comparada às células estreladas da linhagem GRX. Para avaliar a possível ativação celular da GRX frente à estímulos inflamatórios, realizamos ensaios de ativação das células GRX, onde as células foram estimuladas com LPS nas concentrações 100 ng/ml e 500 ng/ml e TGF- β 1 recombinante. Os

resultados obtidos demonstraram que os estímulos utilizados não foram suficientes para induzir e/ou aumentar a expressão de α -SMA em níveis detectáveis por *Western blot* (Figura 23 B).

Figura 23- Avaliação da expressão de α -SMA por *Western blot*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Avaliação molecular da expressão de α -SMA nas células GRX sob condições basais e sob estímulos inflamatórios. **(A)** CTMs e GRXs mantidas sob cultivo basal, incubadas com anticorpo anti- α -SMA. A banda observada (43kDa) corresponde à α -SMA expressa nas CTMs. **(B)** Marcação das amostras do teste de ativação de GRX com anticorpo anti- α -SMA é possível visualizar a única banda marcada correspondente à α -SMA expressa no controle CTM. **SE:** Células GRX cultivadas sem estímulo, em meio DMEM completo; **LPS100:** Células GRX incubadas com LPS na concentração de 100 ng/ml; **LPS500:** Células GRX incubadas com LPS na concentração de 500 ng/ml; **TGFb:** Células GRX incubadas com TGF β 1 na concentração de 1 ng/ml.

6.9.2 Análise da expressão de α -SMA por RTqPCR

Após a RT-qPCR para detecção de α -SMA, a análise dos dados brutos demonstrou que as CTMs precisaram de cerca de 24 ciclos para amplificação do marcador α -SMA e cruzar o limiar de detecção (*threshold*) da reação, enquanto que as células da linhagem GRX precisaram de 32 ciclos para emitir o mesmo sinal, indicando que a GRX expressa α -SMA em níveis menores quando comparada à CTM (Tabela 1). Após o cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando a expressão de β -actina como normalizador, pôde-se observar que a linhagem GRX tem uma expressão de α -SMA 756,8 vezes menor que as CTMs e isto pode ter refletido na dificuldade de se detectar esse marcador nos experimentos anteriores.

Tabela 1- Análise dos dados brutos da RTqPCR para detecção de α -SMA nas GRXs e CTMs

Linhagem	CT β -actina	CT α -SMA	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT}
GRX	20,17207479	32,49794626	12,32587147	0	1
CTM	21,71151543	24,47359657	2,762081146	-9,563790321	756,8115632

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Análise dos dados obtidos na qPCR. Tendo a expressão de β -actina como normalizador, foi calculada a média do Δ Ct das amostras analisadas (triplicatas). Usando a linhagem GRX como referencial, foi possível calcular a expressão relativa de α -SMA pela linhagem CTM, foi possível observar a expressão da proteína alvo 756,8 (α -SMA) vezes mais do que a linhagem GRX.

7 DISCUSSÃO

A terapia celular tem aberto portas para a utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) no tratamento de hepatopatias crônicas e outras doenças crônico-degenerativas e estudos têm comprovado a eficácia terapêutica dessas células após transplante. A utilização de células tronco da medula óssea em modelos animais de fibrose hepática tem se mostrado bastante promissora no que diz respeito à melhora do processo regenerativo e dos aspectos funcionais do fígado (ABDEL AZIZ et al., 2007). Apesar dos bons resultados até então observados, os efeitos benéficos podem ainda necessitar de adaptações ou modificações para que o potencial terapêutico seja maximizado e duradouro (BERSENEV; LEVINE, 2012).

Os avanços nas pesquisas em biotecnologia e terapia celular têm permitido a manipulação genética de CTMs, tornando possível direcionar seu destino e funcionalidade. A modificação genética de CTMs visando a expressão de genes de maneira precisa e controlada, e associando o potencial terapêutico de determinados genes às propriedades das CTMs, tem sido uma prática bem estudada e atrativa (NOWAKOWSKI et al., 2013). A utilização de CTMs geneticamente modificadas para superexpressão de biomoléculas relevantes para determinadas doenças vem sendo descrita como uma ferramenta de melhora dos efeitos terapêuticos pós-transplante (WAGNER et al., 2009). Yu et al. (2009) realizaram o primeiro transplante de CTMs modificadas para a expressão do HGF, em ratos com modelo de fibrose, onde foram observados resultados de redução de áreas de fibrose e redução da ativação de CEHs, no entanto, estudos que busquem avaliar o modo pelo qual as células modularam a atividade de CEHs se fazem necessários.

Fundamentados na literatura, neste presente estudo realizamos a modificação genética de células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de camundongos, no intuito de gerar uma linhagem de CTMs que expressassem HGF, que é um fator de crescimento envolvido em vias de proliferação e que atua fortemente no processo de regeneração hepática. A estratégia usada incluiu a internalização do plasmídeo recombinante pCMV_HGF, carregando o gene do fator de crescimento de hepatócitos, para expressão do HGF além dos níveis celulares basais, visto que as CTMs em condições normais já produzem este fator (MAHER, 1993).

As células obtidas da medula óssea de camundongos C57bl/6 no estudo apresentaram algumas características morfológicas e funcionais que definem as CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SBTC) (BYDLOWSKI et al., 2009, DOMINICI et al., 2006). A aderência seletiva à superfície plástica foi confirmada em nosso estudo e a confirmação da plasticidade celular avaliada pela capacidade de diferenciação destas células em células da

linhagem adipogênica e osteogênica foram demonstradas nos nossos resultados *in vitro*. Após retiradas da medula, as células apresentaram capacidade proliferativa intensa durante as passagens e foram separadas de outras células que não apresentam capacidade aderente inicial (hematopoiéticas) (PHUC et al., 2012) ou após a 5ª passagem (monócitos) (HARTING et al., 2008, SCHREPFER et al., 2007). No nosso estudo pode-se observar, em concordância com os estudos de Pittenger et al. (1999), que o meio de cultivo influencia diretamente o potencial de diferenciação das CTM. De forma semelhante aos estudos de Tropel et al. (2004), observamos que a suplementação do meio de cultura com dexametasona e ácido ascórbico induz uma diferenciação eficiente de CTMs para células com deposição de matriz extracelular de hidroxapatita mineralizada. Com relação à diferenciação adipogênica, há uma heterogeneidade acerca da escolha dos suplementos indutores de diferenciação bem como suas concentrações, como relatado por Scott et al. (2011). A suplementação e concentração dos componentes estabelecidas foram suficientes para induzir de forma eficiente e satisfatória a diferenciação de CTMs em células semelhantes a adipócitos.

Crítérios fenotípicos também têm sido estabelecidos pela SBTC para designar uma população de CTMs (DOMINICI et al., 2006). Presença de antígenos de superfície presentes na maioria das CTMs levou ao estabelecimento de um consenso geral que define os marcadores característicos destas células, no entanto, definir esses marcadores têm sido um problema na caracterização das CTMs e têm gerado conflito entre diferentes autores por conta dos níveis variáveis de expressão dos possíveis marcadores (DE UGARTE et al., 2003, MITCHELL et al., 2006, VARMA et al., 2007, ZUK et al., 2002). A maioria dos marcadores estabelecidos como positivos para CTMs são expressos em uma variedade de células que se relacionam funcionalmente ou não (LIN et al., 2013).

Para as CTMs obtidas de humanos, a SBTC definiu que deveria haver positividade para os antígenos de superfície CD73, CD90 e CD105, e negatividade para a expressão de CD11b ou CD14, CD19 ou CD79a, CD34, CD45 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006). Como não há uma conservação destes marcadores entre as espécies, para murinos é interessante que se use um conjunto de marcadores que sejam mais específicos. Alguns dos marcadores mais consistentemente expressos entre as espécies são CD29 e CD44, mas, uma vez que essas moléculas são expressas por múltiplos tipos de células em muitos tecidos, sua falta de especificidade pode limitar sua utilidade como marcadores (BADDIO et al., 2003, BOXALL; JONES, 2012).

No presente estudo realizamos a imunofenotipagem, como critério de caracterização, para os marcadores CD105, CD73, CD 44, CD29 e Sca-1 estabelecidos como positivos pela

SBTC e para os marcadores CD34 e CD45 estabelecidos como negativos. Todos os principais antígenos de superfície definidos como fundamentais para caracterizar uma população homogênea de CTM apresentaram positividade nas células do trabalho, com expressão variável, onde todas as marcações ocorreram em mais de 60% das células. Nas amostras avaliadas, houve negatividade para CD45, assim como o esperado; entretanto observou-se marcação positiva para a molécula CD34.

A negatividade para o CD45, que é uma glicoproteína de superfície exclusiva de leucócitos e células do sistema hematopoiético é o que vai diferenciar as CTMs das CTHs, indicando a existência de uma população homogênea (YEH et al., 2006). Apesar de ser considerado um marcador negativo para CTMs, o CD34 tem sido alvo de diversos estudos que buscam comprovar a existência de CTMs CD34-positivas, bem como a existência de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) CD34-negativas (BADDON et al., 2003, LIN et al., 2012; SIDNEY et al., 2014). Alguns autores sugerem que a negatividade da marcação para CD34 pode ser um fenômeno induzido pelas condições de cultura em que essas células foram mantidas (LIN et al., 2012). Simmons e Torok-Storb (1991) realizaram análises detalhadas de células-tronco da medula óssea e descobriram que mais de 95% das células cultivadas foram recuperados na fração CD34⁺. Nesse contexto, devido à inconsistência de dados a respeito da positividade do CD34 em CTMs é possível que a expressão do CD34 não seja decorrente da presença de uma população heterogênea, ou de efeitos causados pela manutenção das células em cultura. A variação de expressão de marcadores pode ser comparada a resultados descritos na literatura que levaram à afirmação de alguns autores sobre a possibilidade de não se estabelecer uma cultura totalmente pura de CTMs, mas sim uma cultura de células onde estão presentes CTMs que possuem capacidade de renovação e multipotencialidade (ASTORI et al., 2007, BIANCO, 2001, DOCHEVA, 2007).

Para obtenção de linhagem de CTMs superexpressando HGF foi gerado um plasmídeo recombinante através de técnicas convencionais de clonagem. O plasmídeo de escolha para a expressão do HGF foi o pCMV_LacZ, um vetor de expressão em células de mamíferos que contém originalmente o gene da β -galactosidase (LacZ), cuja expressão é regulada pelo promotor forte do citomegalovírus humano, que é descrito como um promotor que regula altos níveis de expressão de genes em uma variedade de tipos celulares e utilizado frequentemente para expressão de proteínas recombinantes (ADDISON et al., 1997, BOSCHART et al., 1985, SCHMIDT et al., 1990) e sua utilização para modificação de CTMs já foi descrita na literatura (CHO et al., 2009). O plasmídeo é geralmente utilizado como repórter, cuja expressão do gene da β -galactosidase pode ser avaliada e utilizada como controle da expressão plasmidial (LIN et

al., 2013). O gene da β -galactosidase pode ser facilmente excisado do plasmídeo por digestão enzimática realizada com apenas uma enzima de restrição, a *Not I*, e um gene de interesse pode ser inserido no local, procedimento que foi realizado para inserção do gene *Hgf*.

Apesar do alto grau de similaridade (99%) observado entre as sequências (*Hgf* de *Mus musculus* e o gene recombinante do estudo pCMV contendo o gene *Hgf*) comparadas após análise do sequenciamento, a análise comparativa dos eletroferogramas identificou presença de duas mutações adquiridas durante o processo de clonagem, nas quais houve modificação de uma base nucleotídica. Dessa forma, avaliamos se a substituição das bases mutadas na trinca de códons poderia gerar alteração de aminoácido e conseqüentemente prejudicar ou alterar a expressão do HGF.

A análise detalhada da alteração nucleotídica na trinca de códons demonstrou que na primeira mutação, apesar de haver uma troca de nucleotídeos, o aminoácido codificado (leucina) permaneceu inalterado, no entanto, a segunda mutação de troca de um nucleotídeo resultou na troca de uma histidina por uma arginina. O mapeamento da mutação, feito com auxílio das informações disponíveis no banco de dados de proteína pfam -NCBI do HGF, comprovou que a alteração de aminoácidos estava localizada no domínio Kringle (KD- kringle domain) 3 do HGF. Estruturalmente o HGF é constituído por: uma cadeia α que contém um domínio N-terminal bem definido seguido por quatro domínios Kringle (K1-K4) e uma cadeia β que se assemelha a uma serina protease em sequência, mas não possui atividade protease. Os “kringles” são domínios estruturais funcionais e independentes que medeiam a ligação dessas proteínas multidominais a outras proteínas (PATTHY, 1984). Mizuno et al. (1994) e Okigaki et al. (1992) coordenaram estudos onde foram realizadas mutações e/ou deleções nos domínios Kringle, na região N-terminal e na cadeia β , onde foi possível elucidar a interação do HGF com o seu receptor (c-met), e foi possível observar que a região N-terminal e os dois primeiros domínios kringle eram essenciais para o reconhecimento do receptor e que os efeitos biológicos do HGF eram mediados pela interação da cadeia- β com a proteína c-met. Portanto, fundamentados nestes estudos, apesar do HGF recombinante construído no trabalho apresentar uma mutação, esta se localiza em uma região menos conservada do domínio Kringle 3 (região que varia entre diferentes espécies), onde, de acordo com os dados da literatura, não afetariam suas principais funções de ligação e catalítica.

Dentre os métodos de modificação genética de CTMs mais comumente utilizados estão os métodos virais e não-virais. Os métodos virais baseiam-se na inserção de vetores virais integradores do genoma na célula. Geralmente esse método é caracterizado por expressão altamente eficiente e de longo prazo, no entanto, existem questionamentos acerca da segurança

da metodologia empregada, pela utilização do material genético viral, principalmente quando se trata de modificação genética de células para utilização na terapia celular. A vantagem de usar métodos não-virais reside na sua segurança, baixa toxicidade para a célula e facilidade metodológica, além da possibilidade de transportar genes terapêuticos maiores por meio de plasmídeos. Uma desvantagem marcante na utilização de métodos não virais é a duração de expressão do gene terapêutico e a baixa eficiência quando comparado aos métodos virais, que pode exigir uma otimização refinada do processo (NOWAKOWSKI et al., 2013).

A utilização de vetores lipossômicos tem sido empregada em metodologias de transfecção de CTMs (MADEIRA et al., 2010, WANG et al., 2013). A metodologia não viral de inserção de gene por agente lipossômico foi utilizada para modificação genética das CTMs no nosso estudo, e promoveu expressão do gene HGF para além dos níveis basais de expressão pelas CTMs, a partir da transfecção do plasmídeo recombinante (pCMV_HGF); e quando comparadas as duas populações celulares (CTM_HGF e CTM_pCMV), foi mostrado a eficácia do método de transfecção e expressão do HGF promovida pelo pCMV, nas primeiras 48 horas.

No entanto, após realização do co-cultivo das CTMs_HGF e CTMs_pCMV com CEHs, a avaliação confirmatória da superexpressão do gene na célula modificada 96 horas após a transfecção demonstrou que a expressão do gene foi variável nas triplicatas, não foi mantido o perfil de expressão observado nas primeiras 48 horas, o que pode ser explicado pelo método de transfecção não ser integrativo e sim transiente, corroborando os achados de Ward e Stern (2002) e Liew et al. (2007), que observaram que o plasmídeo com promotor pCMV é capaz transfectar e induzir expressão estável em células indiferenciadas, no entanto por um período limitado de tempo. Tais dados não inviabilizam a possibilidade do fator ter sido secretado para o meio exterior da célula e exercer efeitos parácrinos sobre outras células.

A ativação das células estreladas hepáticas (CEHs) é a principal causa de fibrose hepática. Dessa forma, a redução da ativação ou indução da apoptose de CEHs têm se tornado importantes alvos terapêuticos para a fibrose. As evidências dos efeitos imunomodulatórios exercidos pelas CTMs através de mecanismos parácrinos fundamentaram estudos explorando os efeitos que essa população celular exerce sobre CEHs (CAO et al., 2017, NAGAISHI et al., 2014, VAN POLL et al., 2008). Alguns estudos demonstraram que o transplante de células da medula óssea preveniu alterações histopatológicas após exposição crônica do órgão a hepatotoxinas, correlacionadas a uma redução da expressão de células α -SMA positivas, redução do colágeno tecidual e co-localização das células transplantadas e células estreladas, o que sugeriu uma possível comunicação entre estes dois tipos celulares (FANG et al., 2004,

SAKAIDA et al., 2004, ZHAO et al., 2005). No presente estudo avaliamos se a presença de CTMs geneticamente modificadas para a superexpressão de HGF induzir a redução da expressão de α -SMA em células estreladas hepáticas da linhagem comercial GRX, obtida de camundongos esquistossomóticos (BOROJEVIC, 1985). A α -SMA é uma isoforma de actina muito expressa em células de mamíferos, tipicamente presente em células de músculo liso vascular e miofibroblastos, onde se organiza dentro de feixes de microfilamentos (FRIEDMAN, 2008), portanto é bastante utilizada como marcador confiável da ativação de células estreladas hepáticas em diferentes processos patológicos no fígado, incluindo na fibrose hepática, devido à capacidade destas células transdiferenciarem em células com fenótipo de miofibroblastos e passarem a expressar α -SMA (CARPINO et al., 2005, FRIEDMAN, 2008).

Estudos anteriores já relataram os efeitos do co-cultivo CEHs e CTMs humanas mediados pelo HGF. No trabalho de Parekkadan et al. (2007a), por exemplo, foram realizados ensaios *in vitro* de co-cultivo de CTMs humanas e CEHs murinas, onde após 48 horas foram observadas a redução da proliferação e aumento da apoptose de CEHs, processos induzidos, respectivamente pela liberação de IL-10 e HGF; e de Wang et al. (2012), que observaram, através do co-cultivo direto de CTMs e CEHs humanas na presença de HGF recombinante, uma diminuição da proliferação e da ativação das CEHs. No presente estudo, realizamos também o co-cultivo indireto de CTMs modificadas para a superexpressão do HGF com células GRX, onde as células estavam separadas por uma membrana porosa que permite a comunicação celular por mecanismos parácrinos, e em seguida avaliamos a expressão relativa do mRNA de α -SMA. Nos resultados obtidos observamos que não foi detectada a expressão de α -SMA em nenhum dos grupos do co-cultivo (GRX e CTM_HGF e GRX e CTM_pCMV e GRX sozinha), resultado que poderia ser justificado pela perda da ativação das células estreladas, as quais deveriam expressar α -SMA, que é um marcador descrito como confiável para análise da transdiferenciação destas células. Por ser considerada uma célula de linhagem contínua – células que não perdem as características do tecido de origem, possuem alta taxa de proliferação e tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos (MIGITA, 2012) - entende-se que o estado de ativação deveria ser mantido nas passagens subsequentes. Outra possível justificativa para o resultado obtido é que a α -SMA esteja presente na célula numa concentração muito baixa e a metodologia executada não foi possível detectar a sua expressão.

Também foram realizadas dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-17A, IL-6, TNF, INF- γ , IL-10 por citometria e do fator TGF β 1 por ELISA após 24 e 48 horas de co-cultivo das CTMs_HGF e CTMs_pCMV com as células GRX. A dosagem de TGF β 1 demonstrou que não houve alterações significativas na concentração de TGF β 1 no sobrenadante do co-cultivo de

GRX com as CTMs controle (transfectadas com o plasmídeo pCMV – CTM_pCMV) em comparação com o sobrenadante das células GRX em cultivo basal. No entanto, uma redução significativa foi observada quando as células GRX foram co-cultivadas com CTMs modificadas para a superexpressão do HGF – CTM_HGF 48 horas após o co-cultivo, corroborando os achados de Jang et al. (2015) que observaram uma redução significativa do TGF β 1 correlacionada ao aumento significativo do HGF no sobrenadante de CEHs co-cultivadas com CTMs. Narmada et al. (2013) demonstraram que o HGF exerce efeitos antifibróticos pela redução da expressão gênica TGF β 1 com consequente redução na síntese de colágeno I.

Feita a dosagem das citocinas por citometria, constatamos que apenas uma delas (IL-6) se enquadrou dentro do limiar de detecção do kit usado para avaliação por citometria de fluxo. A concentração citocina IL-6 encontrou-se significativamente mais elevada no sobrenadante da célula modificada CMT_HGF co-cultivada com GRX quando comparada à dosagem feita no sobrenadante da GRX cultivada sozinha. A citocina é secretada constitutivamente pelas CTMs, conhecida por seu perfil pró-inflamatório que, no entanto, pode exercer efeitos anti-inflamatórios (SCHELLER et al., 2011), em associação ao HGF estimula a proliferação de hepatócitos (KISS et al., 2008), e também foi associada à manutenção do estado de indiferenciação de CTMs (PRICOLA et al., 2009). Thanunchai et al. (2015) analisaram o perfil de citocinas secretadas por CTMs da medula óssea e de cordão umbilical de humanos e observaram uma secreção predominante de IL6 por todas as populações de CTMs. No microambiente fibrótico, foi observado que as CTMs produzem IL-10 em uma resposta dinâmica à secreção de IL-6 pelas CEHs (GAZDIC et al., 2017). Trabalhos realizados com meio condicionado de CTMs comprovaram que a IL-6 mediou efeitos inibitórios na apoptose de hepatócitos, com redução de até 90%, contribuindo para a regeneração hepática (XAGORARI, 2013). No estudo de Parekkadan et al. (2007a), ao se realizarem co-cultivos de CTMs com CEHs ativadas observaram que a secreção de IL-6 pelas CEHs induziu secreção de IL-10 pelas CTMs. Nasir et al. (2013) realizaram terapia celular com CTMs combinada com administração de IL-6 para tratamento de lesão hepática crônica induzida por tetracloreto de carbono em camundongos e observaram que o tratamento aumentou significativamente a sobrevivência de hepatócitos, sugerindo que a combinação promoveu um microambiente favorável para a regeneração hepática.

Nesse contexto é possível que o fator (HGF) secretado no meio do co-cultivo entre CTM_HGF e GRX esteja modulando a secreção de TGF β 1, os resultados sugerem que CTMs podem estar exercendo efeitos imunomodulatórios sobre CEHs induzindo a redução de TGF β 1 como demonstrado por Jang et al. (2015) além disso, de acordo com os achados de Walia et al.

(2005), os baixos níveis de IL-6 nas células GRXs cultivadas sozinhas poderiam estar relacionados aos níveis elevados de TGF β 1, no entanto, como não foi observada a secreção de nenhuma das outras citocinas associadas à secreção de IL-6 e TGF β 1, não foi possível estabelecer um perfil imunológico entre as células utilizadas, e afirmar com propriedade que as CTMs superexpressando HGF exercem efeitos imunomodulatórios antifibrogênicos.

Diante dos baixos valores encontrados nas dosagens das demais citocinas nos cocultivos e da dificuldade em detectar a expressão de α -SMA no principal alvo de nosso estudo, as células estreladas hepáticas, este estudo tentou avaliar o estado de ativação das células da linhagem GRX mantidas em cultura. Para isso, foi realizada uma caracterização ultraestrutural e molecular desta linhagem, e de forma comparativa, das CTMs cultivadas em condições similares. Trabalhos realizados por Kordes et al. realizados em 2007, 2012, 2013 e 2014 relatam semelhanças funcionais entre CTMs e CEHs.

A linhagem de células estreladas hepáticas GRX é uma linhagem contínua representativa de CEHs murinas, obtidas a partir de granulomas fibróticos induzidos em camundongos C3H/HeN por infecção experimental com *Schistosoma mansoni*, tem sido usada como modelo para estudos *in vitro* com a justificativa de apresentarem aspectos morfológicos e bioquímicos de culturas obtidas diretamente do tecido hepático, secreção de MEC, e apresentarem os fenótipos de miofibroblastos e lipocíticos. (BOROJEVIC, 1985, HERRMANN; GRESSNER; WEISKIRCHEN, 2007).

A caracterização feita por MET demonstrou que as células GRX preservaram muitas características ultraestruturais desde o momento do isolamento e estabelecimento de uma linhagem contínua, como descrito por Borojevic et al. (1985) até o presente estudo. Dentre os principais achados em comum podemos citar: presença de citoplasma rico em ribossomos, retículo endoplasmático rugoso com cisternas dilatadas, aparelho de Golgi, mitocôndrias com cristas definidas, figuras mielínicas e partículas virais, descritas como retrovírus, vistos no interior de vesículas dentro das células e brotando do citoplasma do espaço intracelular para o extracelular. Ambas as avaliações não apresentaram gotículas retinóides, que, segundo Friedman (2008), é um indício de que a CEH não está em estado de quiescência. Entretanto, Borojevic et al. (1985) descreveram a presença de fibras contráteis na região subjacente à membrana celular com densificações locais, características de células de músculo liso, vistas por MET e que não foram observadas em nossas análises. A caracterização da GRX feita por MEV também foi semelhante à descrita por Borojevic et al. (1985), onde a presença das partículas virais sobre as células chamou bastante atenção. Gamarra et al. (2011) realizaram um estudo onde viram a susceptibilidade das células GRX à determinados vírus e observaram que

as células GRX sustentavam, de forma eficiente, a replicação viral e podem servir como uma ferramenta para estudos laboratoriais sobre virologia

Nas caracterizações feitas por MEV e MET, as CTMs apresentaram projeções citoplasmáticas e morfologia fibroblastóide características (PASQUINELLI et al., 2007) além de organelas que indicam intensa síntese proteica. Algumas estruturas observadas na MET compartilharam algumas semelhanças com as células indiferenciadas de camundongos caracterizadas por Alharbi et al. (2014), como: núcleo, organização nuclear, organelas, entre outros. A MEV revelou a presença abundante de estruturas esféricas em grande quantidade, de tamanhos irregulares, emergindo da membrana da célula que se assemelham com as estruturas descritas como vesículas extracelulares. Muitos trabalhos recentes vêm associando a secreção destas vesículas pelas CMTs às suas propriedades imunomodulatórias e terapêuticas, mediadores do contato celular, compostas por membrana celular, contendo em seu interior lipídeos e materiais genéticos, sendo descritas ultraestruturalmente como partículas esféricas de dois subtipos: microvesículas, que medem aproximadamente 100-300nm, e exossomos, que medem aproximadamente 30-100nm, ambos os tipos diferindo na biogênese sendo liberados em resposta ao microambiente (HAGA et al., 2017, LO SICCO et al., 2017, RANI et al. 2015, ZHOU et al., 2016). Alguns estudos conduzidos vêm evidenciando os efeitos terapêuticos destas vesículas extracelulares em doenças hepáticas agudas e crônicas (VOLAREVIC et al., 2014).

As CEHs utilizadas no trabalho (GRX) diferiram das CTMs por apresentarem uma grande quantidade de vírus bem como organelas cuja presença era justificada pela quantidade e presença de partículas virais (vesículas autofágicas e figuras mielínicas), o que elimina qualquer possibilidade das partículas virais serem oriundas de algum tipo de contaminação pelo meio de cultura utilizado no estudo. No estudo conduzido por Borojevic em 1985 foram visualizadas partículas idênticas, no entanto não fica clara a origem do vírus nem a forma como foi conduzida a caracterização dessas partículas virais, gerando questionamentos com relação à segurança e fidedignidade da utilização destas células para experimentos *in vitro*, principalmente em estudos que requeiram avaliações imunológicas. Outro aspecto que chamou atenção na caracterização ultra estrutural foi a não visualização das fibras contráteis visualizadas por Borojevic et al. (1985).

A caracterização molecular do perfil ativado das células estreladas buscou avaliar a expressão de α -SMA nas células GRX cultivadas e utilizadas no decorrer deste trabalho, onde foram constatados baixos níveis de expressão do marcador fibrogênico α -SMA por RT-qPCR, e não houve expressão detectável por *Western blot* nas células mantidas sob condições

normais de cultivo, nem sob estímulos inflamatórios. O LPS é uma macromolécula e endotoxina presente na membrana de bactérias gram-negativas, muito usada na indução de resposta imune em pesquisas *in vitro*. A não detecção de α -SMA nas células GRX frente às diferentes concentrações de LPS e TGF β 1 é um indicativo de que essa linhagem pode não se encontrar no estado ativado e necessitar de estímulos secundários para apresentar marcadores de ativação. Toda et al. (2000), observaram que a proliferação de CEHs *in vitro* aumentava em resposta ao estímulo com LPS após incubação com PBMC de pacientes hepatopatas. Meurer et al. (2013) realizaram estudos comparativos entre linhagens de CEHs amplamente utilizadas em estudos laboratoriais (CEH de cultura primária, GRX, CFSC) e os resultados obtidos demonstram que, entre as linhagens de CEHs estudadas, as células GRX são as que apresentam as marcações mais fracas e/ou negativas para o marcador α -SMA e também para colágeno tipo I. Os resultados da caracterização ultraestrutural e molecular (antes e após estímulos inflamatórios), sugerem que as células GRX, apesar de não apresentarem fenótipo quiescente, também não apresentam características de CEHs em estado “ativado”. Estes dados associados ao fato das células mantidas em cultivo não expressarem, ou expressarem fracamente o marcador α -SMA, reforçam a necessidade de mais estudos de caracterização e comparação entre CEHs obtidas de origens diferentes (cultura primária, células de linhagem comercial) para o estabelecimento do melhor modelo a ser usado em estudos *in vitro* que investiguem os mecanismos da fibrogênese hepática.

8 CONCLUSÕES

- a) O isolamento e a caracterização funcional e ultraestrutural de CTMs demonstraram que foi possível isolar uma população celular com características fenotípicas, morfológicas e de multipotencialidade semelhantes às CTMs descritas na literatura;
- b) A modificação genética para a expressão do HGF demonstrou ser efetiva nas primeiras 48 horas, passando a ser, dessa forma, uma ferramenta para possíveis estudos *in vitro* que busquem avaliar a ação do fator associada ao efeito terapêutico das CTMs em condições patológicas diversas;
- c) O co-cultivo indireto de CTMs superexpressando HGF com CEHs da linhagem GRX demonstrou que houve alteração na secreção das citocinas IL-6 e TGF β 1, no entanto, não pudemos afirmar se as secreções alteradas vistas são ocasionadas por efeitos imunomodulatórios das CTMs sobre as GRXs ou o contrário;
- d) As células GRXs, quando caracterizadas ultraestruturalmente, apresentaram estruturas descritas como partículas virais em grandes quantidades. Este achado associado à baixa expressão de marcadores fibrogênicos pode requerer que mais estudos com estas células sejam conduzidos, a fim de se estabelecer critérios mais confiáveis para estudar a fibrose hepática com esse tipo celular.

REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIZ, M. T. et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. **Clin. Biochem.**, Toronto, v. 40, n. 12, p. 893–899, 2007.
- ADAMSON, I. Y.; BAKOWSKA, J. Relationship of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor levels in rat lung lavage fluid to epithelial cell regeneration after Bleomycin. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 155, n. 3, p. 949–954, 1999.
- ADDISON, C. L. et al., human versus murine cytomegalovirus immediate early gene promoters for transgene expression by adenoviral vectors. **J. Gen. Virol.**, London, v. 78, n. 7, p. 1653–1661, 1997.
- ALHARBI, S. et al. Ultrastructural Characteristics of Three Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cell Lines and Their differentiated Three-Dimensional Derivatives: A Comparative Study. **Cell. reprogram.**, New Rochelle, v. 16, n.2, p.151-165, 2014.
- ALTAMIRANO-BARRERA, A.; BARRANCO-FRAGOSO, B.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N. Management Strategies for Liver Fibrosis. **Ann. Hepatol.**, Mexico, v.16, n.1, p. 48-56, 2017.
- AMER, M. E. et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, London, v.23, n.10, p. 936- 941, 2011.
- AMIN, M. A. et al. Short term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study. **Clin. Transplant.**, Copenhagen, v. 27, n. 4, p. 607-612, 2013.
- ASARI S. et al. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. **Exp. Hematol.**; Copenhagen, v.37, n.5, p. 604-615, 2009.
- ASTORI, G.; et al. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. **J. Transl. Med.**, London, v. 5, p. 55. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2198906/>>. Acesso em: 20 jan. 2018
- BATALLER, R.; BRENNER, D. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.
- BELL, L.; CAI, L. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 294, n.2, p. 336–344, 2008.
- BERARDIS, S. et al. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: Current situation and future prospects. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 21, n. 3, p. 742–758, 2015.
- BERSENEV, A.; LEVINE, B. L. Convergence of gene and cell therapy. **Regen. Med.**, London, v.7, n.6, p.50–56, 2012.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. **Nature**, London, v. 414, n. 6859, p. 118- 121, 2001.

BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 3, p. 445-458, 2007.

BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 827–842, 2004.

BOSHART, M. et al., A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. **Cell**, Cambridge, v.41, n. 2, p. 521–530, 1985.

BRANDÃO, D. et al. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 54–57, 2006.

BRENNER, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. **Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.**, Richmond, v. 120, p. 361–368, 2009.

BURR, A.W. et al., Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 185, n.3, p. 298–302, 1998.

BURT, R. K.; TRAYNOR, A. E. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A New Therapy for Autoimmune Disease. **Stem Cells**, Basel, v. 17, n. 6, p. 366–372, nov. 1999.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 31, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700006>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CAO, H. J. et al., Paracrine effect of bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation, apoptosis, and alphaactin-2 expression in hepatic stellate cells. **Genet Mol Res.**, Ribeirão Preto, v.16, n.1, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28362976>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

CAO, X. et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. **Int. J. nanomed.**, Auckland, v. 6, p. 3335–3349, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229000>>. Acesso em: 22 dez. 2017.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 217, n. 2, p.318-324, 2009.

CARPINO, G. et al. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation, **Dig. Liv. Dis.**, Roma, v.37, n.5, p.349-356, 2005.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells (Dayt.)**, Dayton, v.25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHEN S. et al., Activation of Notch1 signaling by marrow-derived mesenchymal stem cells through cell-cell contact inhibits proliferation of hepatic stellate cells. **Life Sci.**, Oxford, v.89, p.975-981, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/220563751>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

- CHO, W. et al., Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing RANK-Fc or CXCR4 Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice. **Mol. Ther.**, San Diego, v.17, n. 11, p. 1979-87, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603006>>. Acesso em: 2 dez. 2017.
- CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Mult. Scler.**, Houndmills, v. 107, n. 1, p. 367–372, 2006.
- DE GEMMIS, P. et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. **Stem cells Dev.**, Larchmont, v. 15, n.5, p. 719–728, 2006.
- DE UGARTE, D.A.; et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 174, n.3, p.101-109, 2003.
- DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. **Ceres**, Roma, v. 56, n. 4, p. 446–450, 2009.
- DOCHEVA, D.; et al. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. **J. Cell Mol. Med.**, Bucharest, v. 11, n. 1, p.21-38, 2007.
- DOMINICI, M.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, London, v. 8, n. 4, p. 315- 317, 2006.
- DUAN, H. F. et al. Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. **Mol. Ther.**, San Diego, v. 8, n. 3, p. 467–474, 2003.
- DUFFIELD, J.S. et al. Host Responses in Tissue Repair and Fibrosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, Palo Alto, v.8, p.241-276, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092186>>. Acesso em: 8 dez. 2018.
- DZAU, V. J.; GNECCHI, M.; PACHORI, A. S. Enhancing stem cell therapy through genetic modification. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 46, n. 7, p. 1351–1353, 2005.
- ELPEK, G. O. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 20, n. 23, p. 7260–7276, 2014.
- EOM, Y. W.; SHIM, K. Y.; BAIK, S. K. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. **The Korean J. Int. med.**, Seoul, v. 30, n. 5, p. 580–589, 2015.
- FANG, B. et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Transplantation**, Baltimore, v.78, n. 1, p. 83–88, 2004.
- FASBENDER, F. et al. Natural killer cells and liver fibrosis. **Front. Immunol.**, v. 7, n.19, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4731511/>> Acesso: 12 jan.2018.

- FAUSTO, N.; LAIRD, A D.; WEBBER, E. M. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1527–1536, 1995.
- FIGLIORE, E. J.; MAZZOLINI, G.; AQUINO, J. B. Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: Recent findings, old/new caveats and future perspectives. **Stem Cell Rev.**, Totowa, v. 11, n. 4, p. 586–597, 2015.
- FOWELL A.J. et al., Silencing tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) with short interfering RNA reveals a role for TIMP-1 in hepatic stellate cell proliferation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 407, p. 277-282, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300026>>. Acesso em: 12 nov. 2017.
- FRIEDMAN SL. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. **Physiol. rev.**, Bethesda, v.88, n.1, p.125-172, 2008.
- FRIEL, R.; SAR, S. VAN DER; MEE, P. J. Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 57, n. 13, p. 1894–1903, 2005.
- FUCHS, E. et al. Socializing with the Neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, Cambridge, v.116, n. 6, p.769-778, 2004.
- FUNATSU, T. et al. Therapeutic angiogenesis in the ischemic canine heart induced by myocardial injection of naked complementary DNA plasmid encoding hepatocyte growth factor. **J. Thorac. Cardiovasc. Sur.**, St. Louis, v. 124, n. 6, p. 1099–1105, 2002.
- GAZDIC, M. et al. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation of Liver Diseases. **Int. J. Biol. Sci.**, Lake Haven, v.13, n;9, p.1109-1117, 2017.
- GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends Biotechnol**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 397–405, 2013.
- GALLI, R. et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. **Nat. Neurosci.**, New York, v. 3, n. 10, p. 986–991, 2000.
- GAMARRA, M. L. et al., Susceptibility of a continuous murine cell line (GRX) to viral infection. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 2, n. 2, p. 65-69, jun. 2011. Disponível em:<http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232011000200009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 8 dez. 2017.
- GAO, F. et al. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. **Can J. cardiol.**, Oakville, v. 23, n. 11, p. 891–898, 2007.
- GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends Mol. Med.**, Oxford, v.18, n. 19, p. 128-134, 2012.
- GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta Physiol. Scand.**, Stockholm, v. 177, n. 4, p. 437–447, 2003.

GÓMEZ-MAURICIO, G. et al. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model. **Stem Cell Res. Ther.**, London, v. 7, n.1, p.94, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27423905>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

GRESCH, O. et al. New non-viral method for gene transfer into primary cells. **Methods**, San Diego, v. 33, n. 2, p. 151–163, 2004.

GUL-ULUDAG, H. et al. Cationic liposome-mediated CXCR4 gene delivery into hematopoietic stem/progenitor cells: implications for clinical transplantation and gene therapy. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 21, n. 10, p. 1587–1596, 2012.

HAGA, H. et al., Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival from Lethal Hepatic Failure in Mice. **Stem Cells Transl. Med.**, Hoboken, v. 6, n.4 1262–1272, 2017.

HARTING, M. et al., Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. **Cytherapy**, London, v.10, n.3 p.243-253, 2008.

HASHIMOTO, J.; KARIYA, Y.; MIYAZAKI, K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). **Stem cells (Dayt.)**, Dayton, v. 24, n. 11, p. 2346–2354, 2006.

HEMMANN, S. et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **J. Hepatol.**, Amsterdam v. 46, n. 5, p. 955–975, 2007.

HENDERSON, N. C.; IREDALE, J. P. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. **Clin. Sci.**, London, v. 112, n. 5, p. 265–280, 2007.

HERNANDES-GEA, V.; FRIEDMAN, S.L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. **Annu. Rev. Pathol.** Palo Alto, v. 6, p.425–456, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073339>>. Acesso em: 5 out. 2017.

HIGASHIYAMA, R. et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 45, n. 1, p. 213–222, 2007.

HUEBERT, R. C.; RAKELA, J. Cellular therapy for liver disease. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 89, n. 3, p. 414–424, 2014.

INAGAKI, Y. et al. Hepatocyte Growth Factor Suppresses Profibrogenic Signal Transduction via Nuclear Export of Smad3 With Galectin-7. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 134, n. 4, p. 1180–1190, 2008.

IREDALE, J. P. et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 102, n. 3, p. 538–549, 1998.

ITABA, N. et al. Human mesenchymal stem cell-engineered hepatic cell sheets accelerate liver regeneration in mice. **Sci. rep.**, London, v. 5, p. 16169, 2015. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/srep16169>>. Acesso em: 23 out. 2017.

ISSA R. et al., Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 126, n.7, p.1795-1808, 2004.

IWAMOTO, T. et al. Bone-marrow-derived cells cultured in serum-free medium reduce liver fibrosis and improve liver function in carbon-tetrachloride-treated cirrhotic mice. **Cell and Tissue Res.**, Berlin, v. 351, n. 3, p. 487–495, 2013.

JANG, Y. O. et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model. **BMC gastroenterol.**, London, v. 14, n. 1, p. 198, 2014a.

JANG, Y. O. et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. **Liver Int.**, Oxford, v. 34, n.1, p. 33–41, 2014b.

JANG, Y. O. et al., Inhibition of hepatic stellate cells by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in hepatic fibrosis. **Clin. Mol. Hepatol.**, Seoul, v.21, n.2, p.141-149; 2015.

JESUS, R. P. de; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 242–254, 2000.

JIANG, J. X.; TÖRÖK N. J. Liver Injury and the Activation of the Hepatic Myofibroblasts. **Curr Pathobiol Rep.**, [United States], v.1, n. 3, p.215–223, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3748972/>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, London, v. 418, n. 6893, p. 41-49, Jul. 2002.

JIAO, J.; FRIEDMAN, S. L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. **Cur. opin. gastroenterol.**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 223–229, 2009.

KAWAIDA, K. et al. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 91, n. 10, p. 4357–4361, 1994.

KIM, M. D. et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. **Exp. Mol. Med.**, Seoul, v. 46, n. 8, p. e110, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25145391>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

KIRBY, G. T. S. et al., Stem cells for cutaneous wound healing. **BioMed Res. Int.**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/285869/>> Acesso em: 2 jan. 2018.

KISS, J. et al. Mesenchymal stem cells and the immune system – Immunosuppression without drugs. **Orvosi Hetilap**, New York, v. 149, n. 8, p.339-346, 2008.

KORDES, C. et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.352, n.2, p.410-417, 2007

KORDES, C. et al. Stellate Cells from Rat Pancreas Are Stem Cells and Can Contribute to Liver Regeneration. Syn W-K, ed. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.12, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272184>> . Acesso em: 13 fev. 2018.

KORDES C. et al., Hepatic Stellate Cells Support Hematopoiesis and are Liver-Resident Mesenchymal Stem Cells. **Cell Physiol Biochem**, Basel, v. 31, n. 2/3. p. 290-304, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23485574>>. Acesso em:13 fev. 2018

KORDES, C. et al. Stellate cells are mesenchymal stem cells. **Eur. J. Med. Res.**, Munich, v.19, Suppl. 1, p. S6, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4118436/>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

KULTERER, B. et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1–15, 2007. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829400/>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

LAI, L et al. Transplantation of MSCs Overexpressing HGF into a Rat Model of Liver Fibrosis **Mol. Imaging. Biol.**, New York, v.18, n. 1, p. 43-51, 2016.

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

LEMOINNE, S. et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. **Biochim.Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1832, n. 7, p. 948–954, 2013.

LI, J.F. et al.,“Differentiation of hUC-MSC into dopaminergic-like cells after transduction with hepatocyte growthfactor,” **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v.381,n. 1-2, p.183–190, 2013.

LI, L.-Y. et. al., Transplantation of NGF-gene-modified bone marrow stromal cells into a rat model of Alzheimer’ disease. **J. Mol. Neurosci**, Totowa, v.34, n.2, p.157–163, 2008.

LI, T. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes liver regeneration after portal vein embolization in cirrhotic rats. **J. Sur. Res.**, New York, v.184, n. 2, p.1161-1173, 2013.

LI, Q. et al. In Vivo Tracking and Comparison of the Therapeutic Effects of MSCs and HSCs for Liver Injury. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638052>>. Acesso em: 15 set. 2017.

LIEW, C.-G. et al.,Transient and Stable Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells. **Stem cells**, Dayton, v.25, n.6, p.1521–1528, 2007.

LIN, C-S.et al., Is cd34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? **Cytotherapy**, London, v.14, n.10, p.1159–1163, 2012

LIN, C-S. et al., Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: limitations and challenges. **Histol. Histopathol.**, Murcia, v. 28, n. 9, p.1109–1116, 2013.

- LIN, N. et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. **Life Sci.**, Oxford, 85: 291–295, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559033>>. Acesso em: 5 fev. 2018.
- LIN, Y. T. et al. Human mesenchymal stem cells prolong survival and ameliorate motor deficit through trophic support in Huntington’s disease mouse models. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 8, p. 1–17, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850243>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- LIU, X.-S. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells infected with adenovirus expressing HGF promote regeneration of damaged neuron cells in a Parkinson’s disease model. **BioMed Res. Int.**, New York, v. 2014, p. 909657, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25276829>> Acesso em: 10 fev. 2018.
- LJUNGMAN, P. et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. **Bone Marrow Transplant.**, London, v. 45, n. 2, p. 219-234, 2010.
- LO SICCO, C. et al., Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. **Stem cells Transl. Med.**, Durham, v.6, n.3 1018–1028, 2017.
- LUK, J.M. et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cell: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. **J. Immunol. Methods.**, Amsterdam, v.305, n.1, p.39–47, 2005.
- MADEIRA, C. et al. Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2010, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/735349/>>. Acesso em: 3 fev. 2018.
- MADEIRA, C. et al. Gene delivery to human bone marrow mesenchymal stem cells by microporation. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 130–136, 2011.
- MAHER, J. J. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Up regulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. **J. clin. invest.**, New York, v. 91, n.5, p. 2244–2252, 1993.
- MAHIEU-CAPUTO, D. et al. Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. **Hum. Gene Ther.**, Basingstoke, v. 15, 1219–1228, 2004.
- MANGI, A.A. et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. **Nat Med.**, New York, v. 9, n. 9, p. 1195-1201, 2003.
- MATSUMOTO, K., NAKAMURA T. Pleiotropic roles of HGF in mitogenesis, morphogenesis, and organ regeneration. **Gann Monogr. Cancer Res.**, Baltimore, v. 42, 91-112, 1994. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/282416966_Pleiotropic_roles_of_HGF_in_mitogenesis_morphogenesis_and_organ_regeneration>. Acesso em: 5 fev. 2018.
- MEIER, R.P. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? **Stem Cell Res.**, Kidlington, Oxford, v.11, n.3, p.1348-1364, 2013.

MEIRELLES, L.S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Dayton, v.26, n.9, p.2287-2299, 2008.

MEURER, S. K. et al. Overexpression of Endoglin Modulates TGF- β 1-Signalling Pathways in a Novel Immortalized Mouse Hepatic Stellate Cell Line. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2013. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056116>>. Acesso em: 9 jan. 2018

MICHALOPOULOS, G. K.; ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS G. Hepatocyte growth factor. **Hepatology**, Baltimore, v. 15, n. 1, p. 149–154, 1992.

MIGITA, N. A. **Cultivo celular in vitro**: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012. Monografia (Bacharel em Ciências biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/119982>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

MITAKA, T. The current status of primary hepatocyte culture. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 79, n. 6, p. 393–409, 1998.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, Heidelberg, v. 114, p. 185-99, 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752493/>>. Acesso em: 2 set. 2017.

MITCHELL, J.B.; et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem Cells**, Dayton, v. 24, n. 2, p. 376-385, 2006.

MIZUNO, K. et al., Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, n.2, p.1131-1136, 1994.

MIYAGAWA, S. et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure: Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. **Circulation**, Dallas, v. 105, n. 21, p. 2556–2561, 2002.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais : uma breve revisão. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MORMONE, E.; GEORGE, J.; NIETO, N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v. 193, n. 3, p. 225–231, 2011.

MORRISON, S.J. et al. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. **Cell**, Cambridge, v.132, n. 4, p.598-611, 2008.

MUNGUNSUKH, O.; MCCART, E.; DAY, R. Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. **Biomedicines**, Basel, v. 2, n. 4, p. 301–326, 2014.

MURACA, M. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. **Dig. Liver Dis.**, Roma, v. 43, n.3, p. 180-187, 2011.

NAGAISHI, K. et al., Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells. **Hepatology**, Baltimore, v.59, n.5, p.1816-1829, 2014.

NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B., Phys. Biol. Sci.**, Tokyo, v. 86, n. 6, p. 588–610, 2010.

NICOLAS, C. et al. Stem Cell Therapies for Treatment of Liver Disease. **Biomedicines**, Basel, v. 4, n. 1, p. 2, 2016. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28536370>>. Acesso em: 22 set. 2017.

NARMADA, B.C. et al., HGF regulates the activation of TGF- β 1 in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. **J. Cell. Physiol.**, New York, v.228, n.2, p.393-401, 2013.

NIU, J. et al. Prevention of acute liver allograft rejection by IL-10-engineered mesenchymal stem cells. **Clin. Exp. Immunol.**, London v. 176, n. 3, p. 473–484, 2014.

NOWAKOWSKI, A. et al. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. **Acta Neurobiol. Exp. (Wars)**, Warsaw, v. 73, n.1, p. 1–18, 2013.

NOWELL, P. C. et al. Growth and Continued Function of Rat Marrow Cells in X-radiated Mice. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 16, n. 3, p. 258–261, 1956.

OERTEL, M.; SHAFRITZ, D. A. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1782, n. 2, p. 61–74, 2008.

OH S.H. et al., Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 279, n.2, p. 500-504, 2000.

OKIGAKI, M. et al., Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. **Biochemistry**, Moscow, v.31, n.40, p 9555–9561, 1992.

OKUMOTO, K. et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 304, n. 4, p.691-695, 2003.

OLIVEIRA, S.A. et al. Reduction of galectin-3 expression and liver fibrosis after cell therapy in a mouse model of cirrhosis. **Cytotherapy**, London, v.14, n. 3, p.339-349, 2012.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, London, v. 410, n. 6829, p. 701–705, 2001.

ORTIZ, L.A. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington, DC, v.100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.

OYAGI S. et al., Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. **J Hepatol.**, Amsterdam, v. 44, n.4, p. 742-748, 2006.

- OWEN, A.; NEWSOME, P. N. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in liver disease; opportunities and lessons to be learnt? **Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.**, Bethesda, v. 309, n.10, p. 791 - 800, 2015.
- PAREKKADAN, B. et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v. 15, n. 10, p. 1203–1214, 2007a.
- PAREKKADAN, B. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 9, 2007b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895982>>. Acesso em: 6 set. 2017.
- PARK, K.-S.; LEE, Y.-S.; KANG, K.-S. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. **J. Vet. Sci.**, Suwon, v. 7, n. 4, p. 343–348, 2006.
- PASQUINELLI, G. et al., Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived From Bone Marrow and Term Placenta, **Ultrastruc. Pathol.**, New York, v. 31, n. 1, p. 23-31, 2007.
- PATTHY, L. et al., Kringle: modules specialized for protein binding, **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 71, n.1,p. 1873-3468; 1984.
- PEETERS, P. M. et al. Predictive factors for portal fibrosis in pediatric liver transplant recipients. **Transplantation**, Baltimore, v. 70, n. 11, p. 1581–1587, 2000.
- PETERSEN, B.E., BOWEN, W.C., PATRENEETAL, K.D., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, **Science**, Washington, DC, v.284, n. 5417, p.1168–1170, 1999.
- PELLICORO, A. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 14, n. 3, p. 181–94, 2014.
- PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J.P. Reversibility of liver fibrosis. **Fibrogenesis Tissue Repair**, London, v. 5, Suppl. 1, p. 1-4, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368758/>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- PEREIRA, V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública The importance of the use of stem cells for public health. **Cienc. Saude Colet.**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 7–14, 2008.
- PHANEUF, D. et al., Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: Demonstration of impaired liver regeneration. **DNA Cell Biol.**, Larchmont, v. 23, n.9, p. 592–603, 2004.
- PHUC, P.V. et al. Isolation of three important types of stem cells from the same samples of banked umbilical cord blood. **Cell Tissue Bank.**, Dordrecht, v.13, n. 2, p 341–351, 2012.
- PILAT, N.; UNGER, L.; BERLAKOVICH, G. A. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation. **Int. J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 2013, p.1-7, 2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijh/2013/310612/cta/>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, New York, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

POLLOCK, K. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Genetically Engineered to Overexpress Brain-derived Neurotrophic Factor Improve Outcomes in Huntington's disease Mouse Models. **Mol. Ther.**, Cambridge, v. 24, n. 5, p. 965–977, 2016.

POURNASR, B.; MOHAMADNEJAD, M.; BAGHERI, M. In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. **Arch. Iran. Med.**, Tehran, v. 14, n. 4, p. 244–249, 2011.

PRICOLA, K.L. et al., Interleukin-6 Maintains Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Stemness by an ERK1/2-Dependent Mechanism. **J. Cell. Biochem.**, New York, v.108, n;3, p.577-588, 2009.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, New York, v.276, n. 5309, p. 71–74, 1997.

QUINTANILHA, L. F. et al. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. **Hepatol. Res.**, Oxford, v. 44, n. 10, p. E206–E217, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889977> > . Acesso em: 9 dez. 2017.

RAFF, M. Adult Stem Cell Plasticity: Fact or Artifact? **Ann. Rev. Cell and Dev. Biol.**, Palo Alto, v. 19, n. 1, p. 1–22, 2003.

RANI S. et al., Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Mol. Ther.**, Cambridge, v.23, n.5, p.812-823, 2015.

RAPPOLEE, D. A., IYER, A., AND PATEL, Y. Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. **Circ. Res.**, Dallas, v. 78, n.6, p. 1028–1036, 1996.

ROBEY, P. G. Stem cells near the century mark. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 105, n. 11, p. 1489–1491, 2000.

ROCKEY, D. C. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 224-231, 2013.

ROJEWSKI, M.T.; WEBER, B.M.; SCHREZENMEIER, H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. **Transfus. Med. Hemother.**, Basel, v.35, n.3, p.168-184, 2008.

ROUFOSSE, C.A. et al. Circulating mesenchymal stem cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Oxford, v.36, n. 4, p. 585–597, 2004.

SAKAIDA, I. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, Baltimore, v. 40, n. 6, p. 1304–1311, 2004.

SALEHIAND, Z ; RAJAEI, F. Expression of hepatocyte growth factor in the serum and cerebro spinal fluid of patients with Parkinson's disease. **J. Clin. Neurosci.**, Melbourne, v.17, n.12, p.1553– 1556, 2010.

- SANCHEZ-RAMOS, J. et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp. neurol.**, New York, v. 164, n. 2, p. 247–256, 2000.
- SANDERS, R. C. et al. Stem cell research. **Paediatr. Respir. Rev.**, London, v. 7, n. 2, p. 135–140, 2006.
- SCHELLER, J. et al., The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim. Biophys. acta.**, Amsterdam, v.1813, n. 5, p.878-888, 2011.
- SCHMIDT, E. V. et al., The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.10, p.4406–4411, 1990.
- SCHUPPAN, D.; KIM, Y.O. Evolving therapies for liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, New York, v.123, n. 5, p.1887-1901, 2013.
- SCHWARTZ, R.E. et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. **J. Clin. Invest.**, New York, v.109, p. 1291 – 1302, 2002.
- SCHWARZ S.C.; SCHWARZ J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. **Transl. Res.**, New York, v. 156, n. 3, p.155–160, 2010.
- SCOTT, M.A. et al., Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v.20, n.10, p.1793-1804, 2011.
- SCHREPFER, S. et al. Simplified Protocol to Isolate, Purify, and Culture Expand Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v,16, n.1, p.105-108, 2007.
- SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood. **Stem Cells**, Dayton, v. 261, n. 1, p.146–150, 2008.
- SEKI, E.; BRENNER, D. A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. **J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.**, Tokyo, v. 22, n.7, p. 512–518, 2015.
- SHAMS, S. et al. Mesenchymal stem cells pretreated with HGF and FGF4 can reduce liver fibrosis in mice. **Stem Cells Int.**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685159>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- SHU, S.N. et al. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v.10, n.19, p.2818-2822, 2004.
- SHUKLA, M. N. et al. Hepatocyte growth factor inhibits epithelial to myofibroblast transition in lung cells via Smad7. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, New York. v. 40, n. 6, p. 643–653, 2009.
- SIDNEY, L.E. et al., A Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. **Stem Cells** (Dayton, Ohio), Dayton, v.32, n.6, p.1380-1389, 2014.
- SIMMONS, P. J.; TOROK-STORB, B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. **BLOOD**, Washington, DC, v. 78, n. 11, p.2848-2853, 1991.
- SKRTIC, S. et al. Hepatocyte-stimulated expression of hepatocyte growth factor (HGF) in

cultured rat hepatic stellate cells. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 115–124, 1999.

SLACK, J. M. W. Stem cells in epithelial tissues. **Science**, Washington, DC, v.287, n.5457, p.1431-1433, 2000.

SOUZA, V. F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 251–256, 2003.

SPAGGIARI, G. M. et al. Mesenchymal stem cell – natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2 – induced NK-cell proliferation. **Blood**, New York, v. 107, n. 4, p. 1484–1490, 2006.

SPRADLING A., DRUMMOND-BARBOSA D., KAI T. Stem cells find their niche. **Nature**, London, v. 414, n. 6859, p.98–104, 2001.

THANUNCHAI, M., HONGENG, S., THITITHANYANONT, A., Mesenchymal Stromal Cells and Viral Infection. **Stem Cells Int.**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2015/860950/>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 5, n. 10, p. 836–847, 2004.

THEISE, N.D.; KRAUSE, D.S. Toward a new paradigm of cell plasticity. **Leukemia**, London, v. 16, n.4, p. 542-548, 2002.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Adv. Sci.**, London, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.

TODA, K. et al. Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis. **J. Gastroenterol.**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 214–220, 2000.

TROUNSON, A. et al. Clinical Trials for Stem Cell Therapies. **BMC Med**, London v. 9, n. 1741–7015 (Electronic), p. 52, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3098796/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

TROPEL, P. et al., Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, New York, v.295, n.2, p. 395-406, 2004.

VAN DE KAMP J et al. Hepatocyte growth factor-loaded biomaterials for mesenchymal stem cell recruitment. **Stem Cells Int.**, New York, 2013; 2013: 892065.2013. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/sci/2013/892065/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

VAN POLL, D. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. **Hepatology**, Baltimore, v. 47, n.5, p.1634-1643, 2008.

VASSILOPOULOS, G., WANG. P- R., RUSSELL D.W, Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. **Nature**, London, v.422, n.6934, p.901–904, 2003.

VARMA, M.J.; et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 16, n. 1, p. 91-104, 2007

VOLAREVIC, V. et al. Human stem cell research and regenerative medicine present and future. **Bri. Med. Bull.**, London, v. 99, n. 1, p. 155–168, 2011.

VOLAREVIC, V. et al. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. **Stem Cells**, Dayton, v. 32, n. 11, p. 2818–2823, 2014.

WAGNER, J. et al. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 20, n. 5, p. 531–536, 2009.

WALIA et al. TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2, **FASEB J.**, Bethesda, v.17, n.14, p.2130-2132, 2003.

WAN, C.D. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary Pancreatic Dis. Int.**, Singapore, v.7, n.1, p.29-33, 2008.

WANG, J. et al. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. **Hepatol. Res.**, Amsterdam, v. 39, n. 12, p. 1219–1228, 2009.

WANG, L. et al. Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 143, n. 6, p. 1555–1563, 2012.

WANG, P-p, et al. HGF and Direct Mesenchymal Stem Cells Contact Synergize to Inhibit Hepatic Stellate Cells Activation through TLR4/NF-kB Pathway. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.8, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043408>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

WANG, T. et al., Transfection of bone marrow mesenchymal stem cells using green fluorescence protein labeled hVEGF165 recombinant plasmid mediated by liposome. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, Mumbai, v. 6, n. 9, p. 739-742, 2013.

WARD, CHRISTOPHER & STERN, PETER. The Human Cytomegalovirus Immediate-Early Promoter is Transcriptionally Active in Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells. **Stem cells**, Dayton, v.20, n. 10, p.472-475, 2002.

WATT F.M.; HOGAN B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, Washington, DC, v. 287, n. 5457, p.1427–1430, 2000.

WOODBURY, D. et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J. Neurosci. Res.**, New York, v. 61, n. 4, p. 364–370, 2000.

WU, J. et al. Intrastratial transplantation of GDNF-engineered BMSCs and its neuroprotection in lactacystin-induced Parkinsonian rat model. **Neurochem. Res**, New York, v. 35, n.3, p.495–502, 2010.

WYSE, R. D.; DUNBAR, G. L.; ROSSIGNOL, J. Use of genetically modified mesenchymal stem cells to treat neurodegenerative diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 15, n. 2, p. 1719–1745, 2014.

XAGORARI, A. et al. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, Madison, v.6, n. 5, p.831-840, 2013.

XU, R.; ZHANG, Z.; WANG, F.-S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. **Cell. Mol. Immunol.**, Beijing, v. 9, n. 4, p. 296–301, 2012.

YEH, S-P. et al., Induction of CD45 expression on bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Leukemia**, London, v.20, n.5, p. 894–896, 2006.

YANAGITA, K. et al., Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.182, n. 2, p.802–809, 1992.

YASUDA, S. et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores hepatocyte growth factor production in patients with congestive heart failure. **Hypertension**, Dallas, v. 33, n. 6, p. 1374–1378, 1999.

ZARNEGAR, R.; MICHALOPOULOS, G. K.; MICHALOPOULOS, G. The Many Faces of Hepatocyte Growth Factor: from Hepatopoiesis to Hematopoiesis. **J. Cell Biol.**, New York, v. 129, n. 5, p. 1177–1180, 1995.

ZHANG, B. et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2–dependent regulatory dendritic cell population. **Blood**, Washington, DC, v. 113, n. 1, p. 46–57, 2009.

ZHANG, D.; JIANG, M.; MIAO, D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 2, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0016789>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

ZHANG W. et al. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v.13, n.3, p.263-271, 2004

ZHAO, D.C. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v.11, n.22, p.3431–40, 2005.

ZHAO, L. et al. Enhanced cell survival and paracrine effects of mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor promote cardioprotection in myocardial infarction. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 344, n. 1, p. 30–39, 2016.

ZHAO, L.-R. et al. Human Bone Marrow Stem Cells Exhibit Neural Phenotypes and Ameliorate Neurological Deficits after Grafting into the Ischemic Brain of Rats. **Exp. Neur.**, New York, v. 174, n. 1, p. 11–20, mar. 2002.

ZHOU, W. C.; ZHANG, Q. B.; QIAO, L. Pathogenesis of liver cirrhosis. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 20, n. 23, p. 7312–7324, 2014.

ZHOU, J. et al., Characterization of Induced Pluripotent Stem Cell Microvesicle Genesis, Morphology and Pluripotent Content. **Sci. Rep.**, London, V.6, n. 19743, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep19743>> Acesso em: 12 fev. 2018.

ZUK, P.A.; et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.**, New York, v. 7, n.2, p. 211-228, 2001.

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

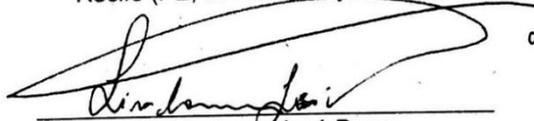
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A SUPEREXPRESSION DE FATORES ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA**” protocolado sob nº 108/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dra **Sheila Andrade de Oliveira** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 11/05/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 11 de maio de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (C57BL6)	382 (20-23 gr/ 30 dias/ machos e fêmeas)
TOTAL	382

We certify that project “**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA A SUPEREXPRESSION DE FATORES ENVOLVIDOS NA REGENERAÇÃO HEPÁTICA**” (CEUA Protocol nº 108/2016) coordinated by **SHEILA ANDRADE DE OLIVEIRA** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on may, 11, 2017. In present version this project is licensed and valid until may 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) May. 11, 2017



Dr Lindomar José Pena
 Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mat. SIAPE: 1971435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / Fiocruz