CRISTIANE CARLIN PASSOS

**Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e
proliferação de células de linhagem hepática, durante o
desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344**

São Paulo

2010

CRISTIANE CARLIN PASSOS

**Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e
proliferação de células de linhagem hepática, durante o
desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2381
FMVZ

Passos, Cristiane Carlin

Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344 / Cristiane Carlin Passos. -- 2010.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Co-orientador: Ricardo Romão Guerra

1. Progranulina. 2. Hepatogênese. 3. Broto hepático. 3. Diferenciação celular. 4. Fígado. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344", protocolado sob o nº 2089/2010, utilizando embriões de 40 (quarenta) ratos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/11/2010.

We certify that the Research "Function of the progranuline growth factor in the hepatic lineage cell differentiation and proliferation during the embryo development of Fischer 344 rats", protocol number 2089/2010, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/24/2010.

São Paulo, 25 de novembro de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PASSOS, Cristiane Carlin

Título: Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico,

A Deus,

Por me permitir viver, errar e aprender;

Aos meus pais, João Passos e Cristina Aparecida Carlin Passos,

Por me incentivarem ao estudo desde criança;

Por me ensinarem a seguir o caminho correto sempre;

Por serem meu alicerce em qualquer situação;

Pelo amor incondicional;

Devo a vocês a pessoa que sou hoje.

A minha filha Ana Beatriz,

Por existir na minha vida e fazer de mim uma pessoa mais forte e feliz;

Por ser minha fonte de inspiração, paixão e entusiasmo;

Por todas as vezes que não pude estar ao seu lado.

Ao meu marido Filipe,

Pela paciência nos momentos de incerteza e ansiedade;

Por fazer minha vida mais feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

- ***Ao Professor Doutor Ricardo Romão Guerra,***

*Pelos ensinamentos acadêmicos, pelos conselhos, calma e paciência;
Por estar sempre disposto a auxiliar;
Pela orientação e amizade.*

- ***A Professora Doutora Maria Angélica Miglino,***

*Pela oportunidade da orientação;
Por possibilitar através de suas contribuições a realização deste projeto.*

- ***A minha amiga Amanda Olivotti Ferreira,***

*Pela amizade, ajuda, companheirismo, conselhos e momentos de diversão;
Por estar sempre ao meu lado quando precisei.*

- ***Ao meu irmão Professor, Mestre e Doutorando Ivan Carlin Passos;***

*Por sempre ter sido um exemplo de dedicação, força de vontade e realização;
Pelos conselhos e motivações.*

- ***Ao colega Doutor Thiago Pinheiro Arrais Aloia,***

*Por suas valiosas contribuições;
Pelo amparo na fase crucial do desenvolvimento deste projeto.*

- ***Aos professores, funcionários e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste;***

- ***A Dra. Cristina Magnabosco e Dra Rosana Tabata Suehiro;***

*Pela confiança em mim depositada e em meu trabalho desde que ingressei na Vigilância Sanitária da Prefeitura de Guarulhos;
Pelo apoio nessa fase final, possibilitando-me finalizar este projeto.*

- ***A FAPESP pela concessão da bolsa .***

RESUMO

PASSOS, C. C. **Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344.** [Function of the progranuline growth factor in the hepatic lineage cell differentiation and proliferation during the embryo development of fisher 344 rats]. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Doenças envolvendo órgãos endodermicamente derivados afetam milhares de pessoas no mundo. O sucesso da terapia celular para o tratamento de doenças de órgãos oriundos da mesoderme e ectoderme gera ótimas perspectivas para o uso do mesmo em tratamento de doenças de órgãos de origem endodérmica (tireóide, pulmões, fígado, vesícula biliar e pâncreas). Particularmente, no fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas em muitas lesões o mecanismo de reparação é insuficiente, tornando o transplante hepático a única opção definitiva. Dentre as células-tronco embrionárias, as células de linhagens hepáticas fetais podem estabelecer-se como fonte importante para a terapia celular em indivíduos com doenças hepáticas, pois possuem um alto índice de diferenciação de hepatócitos e células do ducto biliar *in vitro*. Evidências apontam a progranulina como um fator de crescimento de grande habilidade para a indução de proliferação celular, uma vez que está envolvida no desenvolvimento embrionário e neonatal. Sendo assim, neste trabalho foram utilizados embriões de ratos Fischer 344 com idades gestacionais 12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5 para caracterizar o papel do novo fator de crescimento progranulina na hepatogênese. Foram realizadas análises histológicas, de microscopia eletrônica de transmissão e imuno-histoquímicas nos embriões. Houve expressão de progranulina e Oct-4 (marcador de célula tronco indiferenciada) principalmente nas idades gestacionais de 13,5 a 16,6 dias e 12,5 a 16,5 dias para PCNA (marcador de proliferação celular). Dessa forma acredita-se que, a progranulina atua nos processos de proliferação celular e diferenciação das células-tronco do broto hepático, podendo ser usada como um fator de diferenciação em culturas *in vitro* visando à diferenciação de células-tronco do broto hepático em hepatócitos funcionais para a terapia celular.

Palavras-chave: Progranulina. Hepatogênese. Broto hepático. Diferenciação celular. Fígado.

ABSTRACT

PASSOS, C. C. **Function of the progranuline growth factor in the hepatic lineage cell differentiation and proliferation during the embryo development of fisher 344 rats.** [Função do fator de crescimento progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fischer 344]. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Diseases involving endodermal-derived organs affect thousands of people all over the world. The cell therapy success for treating diseases of organs originated from mesoderm and ectoderm generates excellent perspectives for its use in treating diseases of organs of endodermal origin (thyroid, lungs, liver, gallbladder and pancreas). Particularly in the liver, although regenerative proprieties are attributed in many lesions, the repairing mechanism is insufficient, making the hepatic transplant the only definitive option. Among the embryo stem cells, the fetal hepatic lineage cells may establish themselves as important sources for cell therapy in individuals with hepatic diseases, since they have high ability in hepatocytes and biliar duct cells differentiation *in vitro*. However, for the use of hepatic lineage embryo stem cells as a bi-potential source of differentiation, it is necessary the establishment of efficient proliferation methods in this type of cells. Evidences point to progranuline as a growth factor with high capability for the induction of cell proliferation, since it is involved in the embryo and neo-natal development. Thus, this study used embryos of Fischer 344 rats with gestational ages 12.5, 13.5, 14.5, 15.5 and 16.5 to characterize the role of the new growth factor progranuline in hepatogenesis. We conducted histological, transmission electron microscopy and immunohistochemical in embryos. There was expression of progranuline and Oct-4 (undifferentiated stem cell marker), especially at gestational ages 13.5 to 16.5 days and 12.5 to 16.5 days for PCNA (proliferation marker). So it is believed that progranuline acts on cell proliferation and differentiation of stem cells from the liver bud, which can be used as a differentiating factor in order to cultures *in vitro* differentiation of stem cells from the liver bud into functional hepatocytes for cell therapy.

Key words: Progranuline. Hepatogenesis. Hepatic Bud. Cell Differentiation. Liver.

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP – Alfa-fetoproteína

Alb – Albumina

BMP2 – *Bone Morphogenetic Protein-2*

BMPs – *Bone Morphogenetic Protein*

CD34 – *Cluster Differentiation 34*

CD45 – *Cluster Differentiation 45*

CK14 – *Cytokeratin 14*

CK18 – *Cytokeratin 18*

CK19 – *Cytokeratin 19*

CK8 – *Cytokeratin 8*

CR – *Crow-Rump*

DAB – Diaminobenzidina

E10,5 – Embrião com 10,5 dias

E12,5 – Embrião com 12,5 dias

E13,5 – Embrião com 13,5 dias

E14,5 – Embrião com 14,5 dias

E15,5 – Embrião com 15,5 dias

E16,5 – Embrião com 16,5 dias

E3,5 – Embrião com 3,5 dias

E6,5 – Embrião com 6,5 dias

E8 – Embrião com 8 dias

E8,5 – Embrião com 8,5 dias

E9 – Embrião com 9 dias

E9,5 – Embrião com 9,5 dias

ERK – *Extracellular Signal-regulated Protein Kinase*

F344 – Fischer 344

FGF – *Fibroblast Growth Factor*

FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor-2*

FGF4 – *Fibroblast Growth Factor-4*

H – Hora

H-E – Hematoxilina-Eosina

HGF – *Hepatocyte Growth Factor*
HNF1 α – *Hepatocyte Nuclear Factor 1 α*
HNF1 β – *Hepatocyte Nuclear Factor 1 β*
HNF3 α – *Hepatocyte Nuclear Factor 3 α*
HNF3 γ – *Hepatocyte Nuclear Factor 3 γ*
HNF4 α – *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α*
HNF6 – *Hepatocyte Nuclear Factor 6*
IGF-I – *Insulin-like Growth Factor-I*
IgG – *Imunoglobulina*
MET- *Microscopia Eletrônica de Transmissão*
Oct-4 – *Octamer-4*
P4% – *Paraformaldeído 4%*
PAS – *Periodic Acid Schiff*
PCDGH – *PC Cell Derived Growth Factor*
PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
Pgm – *Progranulina*
pH – *Potencial Hidrogeniônico*
PI-3 – *Phosphatidylinositol-3*
Wnt – *Wingless Transcription Factor*

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

± – Desvio Padrão

≤ – Menor ou Igual

μm – Micrômetro

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

M - Mol

mm - Milímetros

x – Vezes

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Broto hepático de um embrião de rato F344 12,5 dias após a fecundação. CR = $7,23 \pm 0,16$ mm.....	38
Figura 2 –	Broto hepático de um embrião de rato F344 14,5 dias após a fecundação. São identificados a formação de 4 lobos hepáticos. CR = $12,34 \pm 1,30$ mm	39
Figura 3 –	(A) Embriões de rato F344 15,5 dias após a fecundação. (B e C) Isolamento de embriões de rato F344 12,5 dias da placenta	40
Figura 4 –	Fotomicrografias do embrião de rato F344 E12,5 com estruturas identificadas.....	41
Figura 5 –	Fotomicrografias do embrião de rato F344 E13,5 com estruturas identificadas.....	42
Figura 6 –	Fotomicrografia do embrião de rato F344 E14,5 com estruturas identificadas.....	43
Figura 7 –	Fotomicrografia do embrião de rato F344 E15,5 com estruturas identificadas.....	44
Figura 8 –	Fotomicrografia do embrião de rato F344 E16,5 com estruturas identificadas.....	45
Figura 9 –	Fotomicrografias do fígado de embrião de rato F344 E12,5. (B) Ampliação do broto hepático identificando os hepatoblastos	46
Figura 10 –	Fotomicrografias do broto hepático de embrião de rato F344 E13,5	47
Figura 11 –	Fotomicrografias do broto hepático de embrião de rato F344 E14,5	48
Figura 12 –	Fotomicrografias da cavidade abdominal e fígado de embrião de rato F344 E15,5.....	49
Figura 13 –	Fotomicrografia da cavidade abdominal e fígado de embrião de rato F344 E16,5.....	50
Figura 14 –	Fotomicrografias do fígado de embrião de rato F344 E16,5 evidenciando hepatócitos se organizando em cordões	51
Figura 15 –	Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E13,5.....	52
Figura 16 –	Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E13,5.....	53
Figura 17 –	Eletromicrografias do fígado de embrião de rato F344 E13,5	54

Figura 18 – Eletromicrografias do fígado de embrião de rato F344 E15,5 evidenciando hepatócitos se organizando em cordões	55
Figura 19 – Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E16,5 mostrando um hepatócito se organizando em cordões	56
Figura 20 – Reação imuno-histoquímica para PCNA no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5.....	57
Figura 21 – Reação imuno-histoquímica para marcação de células-tronco indiferenciadas hepáticas (Oct-4) no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5.....	59
Figura 22 – Reação imuno-histoquímica para marcação de progranulina no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	23
3.2	HEPATOGENESE	24
3.3	CÉLULAS-TRONCO HEPÁTICAS	26
3.4	PROGRANULINA	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	ANIMAIS	31
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	31
4.3	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	32
4.4	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	33
4.5	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	33
4.5.1	Fixação, inclusão e processamento dos blocos	34
4.5.2	Colorações para microscopia de luz	34
4.5.2.1	Hematoxilina-Eosina (Wallington, 1972)	34
4.5.2.2	Tricômio de Masson (Bancroft, 1996)	34
4.5.3	Citoquímica	35
4.5.3.1	PAS (<i>Periodic Acid Schiff</i>) (Bancroft, 1996)	35
4.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	35
4.6.1	Deteção dos antígenos anti-progranulina, PCNA e Oct-4	35
4.7	MATERIAL FOTOGRÁFICO	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36

4.9	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	36
5	RESULTADOS	37
5.1	COLETA DOS EMBRIÕES.....	38
5.2	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	38
5.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	40
5.3.1	Histologia do embrião	40
5.3.2	Histologia hepática	45
5.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	51
5.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA	56
5.5.1	Imuno-histoquímica para PCNA	56
5.5.2	Imuno-histoquímica para células-tronco indiferenciadas hepáticas (Oct-4)	58
5.5.3	Imuno-histoquímica para Progranulina	60
6	DISCUSSÃO	62
6.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO EMBRIÃO	64
6.2	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EMBRIÃO	66
6.2.1	Avaliação Microscópica do Fígado (Broto Hepático)	68
6.2.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	69
6.2.3	Avaliação Imuno-Histoquímica do Fígado (broto hepático)	69
7	CONCLUSÕES	72
8	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Doenças envolvendo órgãos endodermicamente derivados, particularmente pulmões, fígado e pâncreas, incluindo fibrose cística, hepatite crônica e diabetes respectivamente, afetam milhares de pessoas no mundo. Uma via de tratamento para esses pacientes é estimular a regeneração do tecido atingido *in vivo* ou gerar tecido de substituição *in vitro*. Experimentos com células-tronco têm sido realizados para tratar doenças em órgãos mesodermicamente derivados (sistema hematopoiético), e tecidos ectodermicamente derivados (pele) têm sido cultivados para o tratamento de vítimas queimadas. O sucesso destes tratamentos gera ótimas perspectivas, para a terapia celular em doenças de órgãos oriundos da endoderme (SPENCE; WELLS, 2007).

A camada endodérmica embrionária dá origem ao epitélio do sistema digestório e do trato respiratório, que por sua vez compreende os órgãos: tireóide, pulmões, fígado, vesícula biliar e pâncreas. Particularmente, no fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas, muitas das lesões são tão prejudiciais que este mecanismo de reparação é insuficiente tornando a transplantação a única opção (MURACA et al., 2002; SELDEN; HODGSON 2004).

O uso de hepatócitos primários derivados de um número reduzido de células de fígado adulto para cultivo celular poderia ser utilizado como uma solução para o número limitado de doadores humanos. Contudo, observa-se que estas células não possuem grande habilidade de proliferação *in vitro*. Este mesmo problema não é verificado em células-tronco embrionárias, as quais mantêm seu potencial de diferenciação para diversos tipos celulares e consequentemente as torna fonte importante para a terapia celular (PARK; LEE, 2005). Outra fonte importante são as células de linhagens hepáticas fetais pré-estabelecidas que, de acordo com Kiyota, Matsushita e Ueoka (2007), promovem maior índice de diferenciação.

O desafio atual é identificar métodos que promovam sua diferenciação em linhagens adultas específicas e funcionais (SPENCE; WELLS, 2007). Essas linhagens podem constituir uma proposta futura não só para o tratamento de doenças hepáticas, como

também na elaboração de novos medicamentos, visto que o fígado é o principal órgão de destoxificação do corpo (POUTON; HAYNES, 2005).

Cai et al. (2007) conseguiram, a partir de tratamento com activina, diferenciar 80% das células-tronco embrionárias em células da endoderme definitiva e 70% destas células em hepatócitos através de tratamento simultâneo com o fator de crescimento fibroblástico-4 (FGF4) e proteína morfogenética de osso-2 (BMP2). A diferenciação dessas células em hepatócitos foi confirmada pela expressão de marcadores hepáticos como a AFP, Alb, CK8 e CK18. Outro experimento, utilizando FGF e BMP4 conseguiu 75% de diferenciação em hepatócitos (ZHOU et al., 2007).

A separação de células hepáticas progenitoras em fetos humanos entre 13-20 semanas foi obtida por Nyamath et al. (2007) por meio de separação magnética, isolando as células CD34+, e eliminando as CD45+ (linhagens linfóides e mielóides), aumentando assim em quatro vezes a positividade para AFP (marcador para hepatócitos fetais). Entretanto, apesar do sucesso, apenas 4,1 a 5,5% das células apresentaram-se positivas para CD34 (marcador para células hepáticas progenitoras).

Entretanto para o uso de células-tronco embrionária de linhagens hepáticas como fonte bipotencial de diferenciação em hepatócitos e células do ducto biliar *in vitro*, é necessário, segundo Thomson et al. (1998) o estabelecimento de métodos eficientes de proliferação neste tipo celular.

Evidências apontam a progranulina como um fator de crescimento de grande habilidade para a indução de proliferação celular, uma vez que está envolvida no desenvolvimento embrionário e neonatal (DANIEL et al., 2003). O gene da progranulina é expresso no acrossoma de espermatozóides de cobaias (ANAKWE; GERTON, 1990), em células foliculares ovarianas de folículos em crescimento (DANIEL et al., 2000) e em oócitos de roedores (DÍAZ-CUETO et al., 2000). A expressão de progranulina sofre um decréscimo no desenvolvimento embrionário até o estágio de quatro-células, quando então é re-expresso no estágio de oito-células, aumentando sua expressão até blastocisto, encontrando-se presente nas células do trofoectoderma (DÍAZ-CUETO et al., 2000).

Díaz-Cueto et al. (2000) constataram que o bloqueio da ação da progranulina retarda a formação do blastocisto e que a progranulina exógena têm a capacidade de acelerar o início da cavitação, sendo um fator de crescimento para células do trofoectoderma epitelial. A progranulina é altamente expressa no hipotálamo de ratos masculinos recém-nascidos e de fêmeas neonatas tratadas com andrógenos (SUZUKI et al., 1998). O comprometimento na produção de progranulina hipotalâmica conduz a uma diferenciação sexual danificada do hipotálamo masculino (SUZUKI et al., 2000). Um processo importante no desenvolvimento embrionário e na progressão de tumores é a transição do epitélio-mesenquimal, no qual, conforme descrito por Kierner, Takeuchi e Quinlan (2001), a expressão de progranulina encontra-se moderadamente elevada.

A progranulina ainda está envolvida nos processos inflamatórios (ROTSTEIN et al., 1988) de proliferação (SORIANO et al., 1995), regeneração (TRAUTWEIN et al., 1996; SCHWABE et al., 2003) e de sobrevivência celular (GUERRA et al., 2007). Entretanto, a progranulina também é encontrada no intestino e no fígado de ratos cirróticos (GUERRA et al., 2009), além disso, o uso de anti-progranulina promove aumento de apoptose em células carcinogênicas hepáticas (YASUAKI; CHIHRO, 2005).

Portanto, sabendo-se que a progranulina pode ser usada como um fator de crescimento na diferenciação de células tronco do broto hepático em hepatócitos, o presente trabalho visa identificar a presença de progranulina em diferentes idades embrionárias de ratos Fisher 344, comparando sua atuação com a presença de outros marcadores imuno-histoquímicos como Oct-4 (marcador de célula tronco não diferenciada) e PCNA (marcador de proliferação celular) em células da linhagem hepática através do uso de técnicas histológicas, imuno-histoquímicas e de microscopia eletrônica de transmissão.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho estão descritos a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a função do fator de crescimento progranulina durante a formação e desenvolvimento embrionário do fígado de ratos para uma possível aplicação da progranulina em processos de diferenciação e proliferação de células-tronco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfologicamente o fígado de ratos, através de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão durante diferentes estágios embrionários.
- Identificar os sítios de células-tronco do broto hepático de embriões de ratos em diferentes estágios de maturação até o completo desenvolvimento hepático por meio da marcação com o fator de transcrição Oct-4 (imuno-histoquímica).
- Identificar os sítios de proliferação celular fígado de embriões de ratos em diferentes estágios de maturação até o completo desenvolvimento hepático através da marcação com PCNA (imuno-histoquímica).
- Identificar os sítios com proteína (imuno-histoquímica) de progranulina em embriões de ratos, principalmente fígado, em diferentes estágios de

maturação até o completo desenvolvimento hepático e comparar com as áreas marcadas com Oct-4 e PCNA.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Segue abaixo uma revisão de literatura do assunto abordado nessa dissertação.

3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O desenvolvimento embrionário dos vertebrados tem sido estudado por muito tempo, e durante as últimas duas décadas um enorme progresso foi obtido no estudo da definição das linhagens celulares, do potencial de desenvolvimento celular em embriões jovens e na compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a modelagem e diferenciação celular. O desenvolvimento embrionário no camundongo leva de 18 a 20 dias.

Os dois primeiros folhetos embrionários já se encontram diferenciados no blastocisto no dia 3,5 (em camundongo) após a fecundação (E3,5), sendo que a implantação ocorre um dia mais tarde (KAUFMAN; BARD, 1999; ROSSANT; TAM, 2002). O desenvolvimento prossegue rapidamente após a implantação, com a insinuação do embrião à forma cilíndrica. Subseqüentemente, a formação dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme), no começo da gastrulação (E6,5 em camundongo) ocorre mudanças morfológicas dramáticas. Durante a gastrulação, a disposição do corpo com seus eixos principais são estabelecidos, seguindo-se a organogênese, em torno do dia 10,5 (em camundongo). Nesse momento, o desenvolvimento embrionário da maioria dos órgãos primordiais já está definido (ROSSANT; TAM, 2002).

A endoderme embrionária é uma camada simples de epitélio pavimentado, formada por volta do dia 7,5 (em camundongo), cuja função compreende a formação do trato digestório e respiratório do embrião. Seguindo-se a isso, dentro de 24 h iniciam-se movimentos morfogenéticos na região anterior da endoderme, que resultam na formação do intestino primitivo anterior cujo epitélio, nesse estágio, é cubóide. O intestino anterior dá origem à tireóide, pulmões, fígado, vesícula biliar, estômago e

pâncreas. Dentre as vias que implicam na formação do intestino anterior, estão FGF, Wnt, ácido retinóico e hedgehog (GRAPIN-BOTTON, 2005).

Embriões devem ser classificados de acordo com a idade, comprimento, peso ou número de somitos, no caso de espécies jovens. O desenvolvimento do camundongo é similar ao do rato, com algumas diferenças, nos ratos o desenvolvimento é mais avançado do que em camundongos em alguns estágios. Geralmente quando o período gestacional é curto, o desenvolvimento embrionário é rápido e o número de filhotes em uma ninhada é grande. Neste caso, o ritmo de desenvolvimento difere sensivelmente nas fases iniciais, mas nos estágios posteriores as diferenças tendem a ser menores (MONIE, 1976).

O desenvolvimento embrionário dos ratos é similar ao dos outros vertebrados, a gastrulação inicia-se no oitavo dia de gestação (E8,5). A formação dos somitos começa no final de E9,5 e durante E10,5, quando o intestino anterior e posterior tornam-se visíveis e o processo de desenvolvimento hepático se inicia, o que se dá pela conectividade da endoderme do intestino anterior com o desenvolvimento do coração. Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) sinalizam o início do septo transversal e o desenvolvimento do coração respectivamente, e fatores de transcrição ativam genes hepáticos específicos que regulam a hepatogênese (GOTTINGEN, 2006).

3.2 HEPATOGENESE

O processo de hepatogênese é composto por múltiplos estágios de desenvolvimento. Durante o desenvolvimento embrionário, a indução da destinação hepática depende de interações recíprocas entre o endoderma ventral do intestino anterior e o tecido mesenquimal adjacente (ZARET, 2002). Aproximadamente no E8 (em camundongo) a parede ventral do endoderma do intestino anterior inicia seu desenvolvimento para uma destinação hepática em resposta às ações indutivas de fatores de crescimento, incluindo FGF liberado pelo mesoderma cardíaco adjacente

e pelas BMPs advindas do mesênquima do septo transversal (DUNCAN, 2003; BAHARVAND et al., 2006).

As células da endoderme do intestino anterior começam a proliferar e diferenciar em hepatoblasto, levando à formação do broto hepático em E9 (em camundongos). Uma vez que o broto hepático é gerado e os hepatoblastos do intestino anterior migram formando cordões em direção ao septo mesenquimal transversal, as células dentro do ambiente hepático embrionário se organizam para uma segunda diferenciação celular gerando uma arquitetura hepática complexa (ZHAO; DUNCAN, 2005).

A diferenciação do hepatoblasto em hepatócitos e em células do epitélio biliar (colangiócitos) começa em torno do E13,5 (em camundongos). Esta diferenciação final, na linhagem celular hepática em camundongos, ocorre até por volta do E17, quando: a maior parte das células adota uma morfologia cuboidal característica; observam-se canálculos formados no tecido; e detectam-se enzimas e proteínas necessárias para o exercício da função hepática nas células que formam o fígado do embrião (MCLIN; ZORN, 2006).

O fígado embrionário representa o maior sítio de hematopoiese durante o desenvolvimento embrionário. Nos ratos, o broto hepático começa a se desenvolver com 10 dias de gestação (E10,5), juntamente com a maturação da medula óssea e baço, as células hematopoiéticas saem do fígado para suas destinações finais, enquanto o fígado inicia a organização de sua estrutura e desenvolve numerosas funções metabólicas tornando-se maduro (GOTTINGEN, 2006).

Dentre os fatores envolvidos na regulação do desenvolvimento hepático encontram-se HNF1 α e β , HNF3 α e γ , HNF4 α , HNF6 (DUNCAN, 2000; COSTA et al., 2003) e Cited2 (QU *et al.*, 2007). Trabalhos sugerem que HNF4 α atua como regulador central da hepatogênese, através da ativação da cascata de fatores de transcrição que geram o perfil final da expressão gênica do hepatócito maduro (WATT; GARRISON; DUNCAN, 2003). Para Parviz et al. (2003) e Rhee et al. (2003) o HNF4 α é o maior regulador da expressão gênica hepática, atuando tanto no desenvolvimento, como na diferenciação celular em linhagem hepática.

O Cited, conforme descrito por Withington et al. (2006), também desempenha função essencial no desenvolvimento embrionário hepático em camundongo. Ela é altamente expressa por fígados fetais do E12,5 até E16,5 (QU et al., 2007). Na embriogênese do camundongo, a expressão do Cited2 também é evidenciada nos mesênquima do septo transversal, a região a qual dá origem ao fígado maduro (DUNCAWOODIE; RODRIGUEZ; BEDDINGTON, 1998) e possui atuação como co-ativador do HNF4 α . Outro fator de crescimento, o HGF, também está envolvido na hepatogênese, atuando na manutenção dos hepatócitos a partir da metade da hepatogênese (BAHARVAND et al., 2006).

As células não diferenciadas do epitélio hepático de ratos, conforme observações de Bisgaard et al. (1994) expressam CK14 e vimentina. Enquanto que uma vez diferenciadas em hepatócitos expressam albumina, AFP, CK18 e glicogênio e as células do ducto biliar expressam glutamyl transpeptidase (GGT) e CK19 (BADVE et al., 2000). No entanto, o fígado embrionário não possui muitas das funções hepáticas de um vertebrado adulto, que o torna centro metabólico do organismo, sendo estas adquiridas durante os estágios peri e pós-natal.

3.3 CÉLULAS-TRONCO HEPÁTICAS

Sabendo-se que doenças do fígado estão associadas com uma redução acentuada na massa viável dos hepatócitos, que os casos mais graves de doença do fígado (insuficiência hepática) são tratadas através de transplante hepático, e que uma alternativa ao transplante de órgãos inteiros para pacientes com insuficiência hepática (fígado e doença hereditária) é o transplante hepático, tornou-se necessário o estudo de outras alternativas para esses tipos de tratamento, uma vez que a escassez de doadores de órgãos inviabilizam a quantidade de transplantes necessários. Outras formas de transplante têm sido propostas, incluindo células tronco embrionárias, células hepáticas imortalizadas e células indiferenciadas. O estudo de células progenitoras hepáticas também vem crescendo, uma vez que, seu potencial terapêutico reside na sua capacidade de proliferar e diferenciar em hepatócitos e colangiócitos (SANGAN; TOSH, 2010).

O fígado também apresenta significativo papel durante a hematopoiese fetal. Este órgão é responsável por diferenciar os progenitores em células diferenciadas da linhagem hematopoiética durante o desenvolvimento fetal. Na fase hematopoiética, este órgão é rico em células-tronco hematopoiéticas e células eritróides, e com uma menor proporção de linfócitos e granulócitos (ZANICHELLI et al., 1995).

Desde então, diversos estudos tem surgido com células-tronco e sua diferenciação em linhagem de células hepáticas. Lu et al. (2010) utilizou blastocistos de embriões humanos descartados para cultura e conseguiu diferenciá-los em hepatócitos com 70-80% de proteínas expressas de um hepatócito maduro.

Fausto (1994) já relatou em suas pesquisas com células-tronco a sua alta capacidade proliferativa e regenerativa através de células hepáticas, no entanto, a capacidade regenerativa por meio de células maduras altamente diferenciadas é limitada (FAUSTO, 1994; GRISHAM; THORGEIRSSON, 1997). Kubota e Reid (2000) citam que quando o dano é severo afetando a auto-renovação de hepatócitos, somente através da expansão e diferenciação das células-tronco do fígado torna-se possível a regeneração.

Trabalhos com células de cordão umbilical também são uma importante opção para diferenciação em células hepáticas. Teramoto et al. (2005) demonstrou que tanto em células-tronco embrionárias quanto nas células de cordão umbilical há formação de células progenitoras hepáticas induzidas por auxílio de fatores de crescimento. Albumina e citoqueratina 19 (CK19) foram usadas como imuno-marcadores dessas células (TERAMOTO, et al., 2005).

SOTO-GUTIERREZ et al. (2007) estudou através de culturas de células-tronco de embriões de camundongos a diferenciação em hepatócitos e descreveu 4 etapas envolvidas: (1) formação de corpos de embrião; (2) indução a endoderme definitiva aos 2 dias de idade do embrião; (3) indução das células progenitoras hepáticas; (4) maturação dos hepatócitos. A diferenciação hepática é concluída aos 16 dias de cultura e as células foram induzidas a se diferenciarem em endoderme definitiva com a adição de ativina e fator de crescimento de fibroblasto-2 (*fibroblast growth factor-2* - FGF-2). A diferenciação e maturação hepática das células são realizadas pela

retirada de ativina e FGF-2 e exposição a fatores de crescimento de células hepáticas não parenquimatosas.

3.4 PROGRANULINA

Progranulina (Pgrn) ou PCDGH (fator de crescimento derivado da célula PC) é um novo fator de crescimento, também conhecido como precursor epitelial (PLOWMAN et al., 1992) e acrogranulina (BABA et al., 1993). Células epiteliais de ciclo rápido de animais adultos, como queratinócitos e alguns enterócitos específicos, expressam o gene da progranulina em altas concentrações, enquanto em células epiteliais mais quiescentes, tal como às do pulmão ou dos túbulos renais sua expressão é relativamente baixa (DANIEL et al., 2000).

Em mamíferos a progranulina é mitogênica para diversas células do organismo (ZHOU et al., 1993; XU et al., 1998; DANIEL et al., 2000). Níveis muito elevados no epitélio, de acordo com He e Bateman (1999) e He et al. (2002) podem conferir ao epitélio tumorigenicidade e invasividade. A expressão de progranulina tem sido verificada em diversos tipos de processos tumorais, como em câncer de mama (LU; SERRERO, 1999, 2000, 2001), glioblastomas (LIAU et al., 2000), carcinomas renais (DONALD et al., 2001) e câncer ovariano invasivo (JONES et al., 2003), apresentando-se com níveis de expressão mais elevados que nos mesmos tecidos em estado normal.

A progranulina ativa o sinal de cascata das quinase ERK e PI-3 (ZANNOCO-MARANI et al., 1999; LU; SERRERO, 2000; HE et al., 2002), e estimula um aumento das ciclinas D1 e -B (ZANNOCO-MARANI et al., 1999; LU; SERRERO, 2000). Segundo Xu et al. (1998), a progranulina difere dos fatores de crescimento “clássicos”, pois possui a habilidade única de contornar o bloqueio mitótico imposto à fibroblastos embrionários de roedores quando na ausência de fatores de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I).

Os diversos estudos a respeito da progranulina apontam para seu envolvimento na estimulação da proliferação celular (SORIANO et al., 1995; LU; SERRERO, 2000) e no ancoramento, crescimento (BATEMAN; BENNETT, 1998; HE; BATEMAN, 1999; CHEUNG et al., 2004; PAN et al., 2004; TANGKEANGSIRISIN; HAYASHI; SERRERO, 2004) e desenvolvimento (DIAZ-CUETO et al., 2000; DANIEL et al., 2003) independente de células. A progranulina aumenta a sobrevivência de fibroblastos sob estresse e é expresso (por proteína e RNA) em fígados cirróticos principalmente nas áreas de proliferação de ductos biliares e septos fibrosos (GUERRA et al., 2007, 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão descritos as metodologias utilizadas para a execução da proposta em questão.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos Fischer 344, pesando aproximadamente 200 gramas, sendo 35 fêmeas e 5 machos. Os animais foram identificados e acondicionados em gaiolas de polipropileno (41 x 34 x 16) forradas com serragem (maravalha) trocadas a cada 5 dias e tampadas por grade metálica, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (45% - 75%), com ciclo de 12 horas de claro/escuro. Os animais receberam água (filtrada, $\text{pH} \pm 7.0$) e ração (Nuvilab) em regime *ad libitum* por todo o período experimental. Os animais utilizados no experimento foram provenientes do biotério (padrão SPF) do Instituto de Química da USP (IQ – USP). Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Bioética da FMVZ/USP com número de protocolo 2089/2010.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As fêmeas foram alojadas em grupos de três. Os machos foram alojados individualmente, sendo as fêmeas transferidas para as caixas dos machos ao fim da tarde para pernoite, sendo retirados na manhã seguinte entre as 7-8 horas da manhã. Preconizou-se a utilização de duas a três fêmeas para cada macho.

No dia seguinte esfregaços vaginais foram avaliados para averiguação do ciclo estral e presença de espermatozóides indicativos de acasalamento. O esfregaço foi realizado com auxílio de *swab* e colocado sob lâmina histológica para análise ao microscópio óptico. Como a visualização de um ou mais espermatozóides ao

microscópio óptico é indicativo de acasalamento, fêmeas acasaladas foram alojadas individualmente em gaiolas evitando estresse durante o período gestacional. A contagem do período embrionário se iniciou 0,5 dia na manhã após a fecundação, assim como o controle de peso e da conformação abdominal dos animais. Foram utilizadas no experimento as seguintes idades gestacionais: embrião 12,5 dias (E12,5); E13,5; E14,5; E15,5 e E16,5.

4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram eutanasiadas 35 ratas prenhas isogênicas F344 de cada período gestacional. Os animais receberam dose excessiva de anestésico inalatório Isoflurano¹ (CLOSE et al., 1996, 1997) administrado através de circuito de Magill, em oxigênio 100%, por meio de um aparelho de ventilação mecânica², com auxílio de máscara de tamanho apropriado. A entrada do animal em anestesia foi verificada pelas frequências cardíaca e respiratória, pelo grau de relaxamento muscular e reflexos digitais.

Em cada período gestacional (E12,5, E13,5, E14,5, E15,5 e E16,5) foram coletados 10-12 embriões, por meio de incisão da pele na linha média no sentido pré-retroumbilical. Os ovários foram identificados e, com o auxílio de duas pinças hemostáticas colocadas nos pedículos ovarianos, estes foram suspensos e exteriorizados. A porção inicial do corno uterino prenhe também foi pinçada, seguida pela remoção de todo corno uterino. Incisões cirúrgicas nos sacos gestacionais foram realizadas a fim de promover a exposição dos embriões, bem como dos anexos fetais. Os embriões foram coletados com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss³ do Laboratório de Cultivo Celular do Setor de Anatomia da FMVZ-USP. Após serem colocados em placas de petri, os embriões foram lavados com solução de PBS-L e depois fixados. Concomitantemente a coleta dos embriões, realizou-se a coleta do broto hepático através de uma incisão longitudinal no

¹ Cristália, Brasil

² Takaoka 640, Brasil

³ Berlim, Alemanha

intestino primitivo dos embriões com o auxílio das lupas estéreo microscópica⁴ e cirúrgica⁵, e instrumental cirúrgico adequado para microcirurgia.

Todo o material biológico foi coletado sob condições assépticas adequadas. Os materiais cirúrgicos utilizados, a superfície de contato e o ambiente laboratorial foram esterilizados, reduzindo assim as chances de qualquer tipo de contaminação das amostras. O procedimento experimental de coleta das amostras biológicas foi realizado dentro do fluxo laminar do Laboratório de Cultivo Celular no Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

4.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os períodos gestacionais foram estimados a partir de mensurações da distância occípto-sacral da cabeça, tomando como referência a crista nuchal numa extremidade e a última vértebra sacral na extremidade oposta (Crow-Rump / CR) (EVANS; SACK, 1973), medidos com auxílio de um paquímetro⁶ inoxidável com divisões em milímetros (150 mm x 0,02 mm).

4.5 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A seguir estão descritos os procedimentos para processamento histológico dos embriões. O material biológico coletado foi processado no Laboratório de Histologia do Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

⁴ Zeiss, Stemi DV4

⁵ Leica

⁶ Eletronic Digital Caliper

4.5.1 Fixação, inclusão e processamento dos blocos

Os embriões foram fixados em solução de Methacarn e Paraformaldeído 4% (P4%). Após fixação, que durou em torno de 12 horas, as amostras foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão do embrião inteiro em paraplast®⁷ (JUNQUEIRA, 1995).

Foram realizados cortes seriados de todo embrião de 5 µm de espessura obtidos através de um micrótomo automático⁸. Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa⁹ a 60°C.

4.5.2 Colorações para microscopia de luz

Foram utilizadas as seguintes colorações:

4.5.2.1 Hematoxilina-Eosina (Wallington, 1972)

Essa técnica foi utilizada para observação do aspecto histomorfológico do tecido.

4.5.2.2 Tricômio de Masson (Bancroft, 1996)

Essa técnica foi utilizada para observação do aspecto histomorfológico do tecido.

⁷ Paraplast Embedding Media, Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab., USA

⁸ Leica, RM2165

⁹ Fanem

4.5.3 Citoquímica

4.5.3.1 PAS (*Periodic Acid Schiff*) (Bancroft, 1996)

Essa técnica foi utilizada para observação de glicogênio intracelular hepático.

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A seguir a descrição da reação de imuno-histoquímica para os anticorpos que seguem:

4.6.1 Detecção dos antígenos anti-progranulina, PCNA e Oct-4

Foram utilizados os anticorpos primários progranulina (1:100 - cedido gentilmente pelo Dr. Andrew Bateman, produzido em seu Laboratório – Endocrinology Laboratory/ Victoria Hospital/ McGill/ Canadá), PCNA (antígeno celular de proliferação; 1:100 - Dako), Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*; 1:200 – Santa Cruz) em 5 animais por período embrionário. Os cortes histológicos foram coletados em lâminas silanizadas, desparafinados e desidratados seguindo o protocolo padrão. As lâminas foram submetidas ao procedimento de desmascaramento antigênico, utilizando tampão citrato (pH 6.0), durante 12 minutos em microondas. Após, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase em solução de H₂O₂ 5%, diluído em metanol, durante 30 minutos. Após lavagens com PBS, o bloqueio antigênico das lâminas foi realizado em solução de leite desnatado a 5%, durante 20 minutos e à 37°C. Posteriormente, os cortes foram lavados e incubados em câmara úmida, *overnight* e a 4°C, com anticorpos diluídos em PBS. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários biotinilado, durante 30 minutos, seguidas da incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase

(LSAB - Dako), durante 30 minutos. As células positivas foram evidenciadas após a coloração com DAB (Dako). As lâminas foram incubadas com controles positivos de alguns anticorpos. Também foram realizados controles negativos de todas as reações, utilizando IgG correspondentes a cada tipo de anticorpo testado. A marcação nuclear (PCNA) foi quantificada pela contagem aleatória de 1000 células, considerando a porcentagem de células positivas. As marcações citoplasmáticas (Progranulina e Oct-4) foram avaliadas e classificadas de acordo com a intensidade: leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

4.7 MATERIAL FOTOGRÁFICO

As fotomicrografias foram realizadas por meio do software KS400¹⁰. Utilizou-se o microscópio OLYMPUS¹¹ e a câmera AxioCam¹² para o procedimento.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística da imuno-histoquímica foi empregado o programa Minitab®¹³, a análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Tukey-Kramer. Os resultados com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os embriões foram fixados (2 embriões por período gestacional) em Karnovsky e glutaraldeído¹⁴ 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Os brotos hepáticos dissecados foram seccionados e recortados em fragmentos de 1x1mm. Os

¹⁰ KS400, 4.4, marca ZEISS, ANO 2000.

¹¹ Modelo BX60

¹² Modelo HCr, marca ZEISS

¹³ Release 15 Statistical Software (State College, PA - EUA)

¹⁴ Glutaraldehyde grade I: 70% aquoso solution – Sigma chemical Co., USA

fragmentos foram lavados em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4 por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio¹⁵ 1% por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato o material foi desidratado em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno¹⁶ e resina¹⁷. Na seqüência, essa mistura foi substituída por resina pura por 5 horas e incluídas em moldes, permanecendo em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Os blocos foram cortados em ultra-micrótomo¹⁸. Cortes semi finos de 1µm de espessura foram obtidos corando-se à quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio de luz.

Cortes ultrafinos de cerca de 60nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos. As telas foram levadas ao microscópio eletrônico de transmissão¹⁹ para visualização das ultra-estruturas. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP.

¹⁵ Osmium tetroxide 4% w/w solution in water – polyscience, Inc., USA

¹⁶ Propylene oxide EM Grade, Polysciences, Inc, USA

¹⁷ Araldite – 502 EMBEDDING, Kit-Electron Microscopy Sciences, USA

¹⁸ Leica, Ultracut UCT®

¹⁹ Morgagni, modelo 268D, Microscópio Eletrônico de Transmissão, Philips

5 RESULTADOS

A seguir os resultados de todas as metodologias aplicadas no experimento.

5.1 COLETA DOS EMBRIÕES

Foram coletados 10 embriões de cada idade gestacional: E12,5; 13,5; 14,5; 15,5 e 16-5.

5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os embriões foram coletados e, com o auxílio de uma lupa esteroscópica, foram localizados os brotos hepáticos e medido o Crow-Rump (CR) (Figura 1).

Figura 1 – Broto hepático de um embrião de rato F344 12,5 dias após a fecundação. CR = $7,23 \pm 0,16$ mm

Os aspectos macroscópicos do fígado de E14,5 são mais bem definidos, estando distintos 4 lobos hepáticos (Figura 2).

Figura 2 – Broto hepático de um embrião de rato F344 14,5 dias após a fecundação. São identificados a formação de 4 lobos hepáticos. CR = $12,34 \pm 1,30$ mm

Os brotos hepáticos dos embriões E15,5 (Figura 3-A) e E16,5 coletados apresentaram um maior volume em decorrência de sua crescente idade embrionária. A figura 3-B e C demonstra a dissecação do embrião de rato F344 E12,5, isolando-o da placenta.

Figura 3 – (A) Embriões de rato F344 15,5 dias após a fecundação. (B e C) Isolamento de embriões de rato F344 12,5 dias da placenta

5.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Foram realizados cortes histológicos e colorações de hematoxilina-eosina, tricômio de Masson, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Picrossírius em todos os períodos embrionários propostos.

5.3.1 Histologia do Embrião

Os embriões E12,5 tiveram as seguintes estruturas identificadas: 4º ventrículo encefálico, mesencéfalo, prosencéfalo, início da cavidade nasal, coração com divisão atrial e ventricular, neuroporo caudal e o broto hepático (Figura 4-A e B).

Legenda: (A) CR: $7,31 \pm 0,16$ mm. Coloração Hematoxilina-eosina (HE). Barra = 500 μ m. (B) CR: $7,23 \pm 0,16$ mm. Coloração Hematoxilina-eosina (HE). Barra = 500 μ m

Figura 4 – Fotomicrografias do embrião de rato F344 E12,5 com estruturas identificadas

Os embriões E13,5 tiveram as seguintes estruturas identificadas: medula espinhal, presença das vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), somitos, costelas e musculatura axial, formação mandibular, cavidade nasal, coração com cavidade divisão atrial e ventricular e continuação da segmentação hepática em 2 brotos (Figura 5-A e B).

Legenda: (A) CR: $9,30 \pm 0,43$ mm. Coloração: Tricômio de Masson. Barra = 500 µm. (B) CR: 9,51 mm. Coloração Hematoxilina-eosina (HE). Barra = 500 µm

Figura 5 – Fotomicrografias do embrião de rato F344 E13,5 com estruturas identificadas

Os embriões E14,5 tiveram as seguintes estruturas identificadas: maior desenvolvimento na região cefálica (caverna nasal), junção dos dois segmentos hepáticos e estruturas já evidenciadas nos embriões anteriores (Figura 6).

Legenda: * Junção dos dois segmentos hepáticos (também indicado por seta). CR: $12,34 \pm 1,30$ mm. Coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS). Barra = 500 μ m

Figura 6 – Fotomicrografia do embrião de rato F344 E14,5 com estruturas identificadas

Os embriões E15,5 tiveram as seguintes estruturas identificadas: continuação do desenvolvimento na região cefálica (cavidade nasal), crescimento hepático com formação de sua histoarquitetura e estruturas já evidenciadas nos embriões anteriores (Figura 7).

Legenda: Coloração: HE. Barra = 500 μ m

Figura 7 – Fotomicrografia do embrião de rato F344 E15,5 com estruturas identificadas

Os embriões E16,5 tiveram as seguintes estruturas identificadas: possui as mesmas estruturas já evidenciadas nos embriões anteriores, porém com maior desenvolvimento a se incluir o fígado (Figura 8).

Legenda: Coloração: HE. Barra = 500 μ m

Figura 8 – Fotomicrografia do embrião de rato F344 E16,5 com estruturas identificadas

5.3.2 Histologia Hepática

Os embriões apresentaram hepatoblastos (células precursoras dos hepatócitos) ainda desorganizados e circundados por inúmeras células precursoras sanguíneas nucleadas nesta fase denominadas eritroblastos (Figura 9-A e B).

Legenda: (A) * Broto hepático de E12,5. Coloração: HE. Barra = 200 μ m. (B) Setas indicam hepatoblastos e eritroblastos de E12,5. Coloração: HE. Barra = 20 μ m

Figura 9 – Fotomicrografias do fígado de embrião de rato F344 E12,5. (B) Ampliação do broto hepático identificando os hepatoblastos

Em maior aumento observa-se que os hepatoblastos são células com núcleo grande basofílico e pouco citoplasma. Estas estão circundadas por inúmeros capilares

sanguíneos com eritroblastos. Sinusóides e células de Kupffer também são encontradas (Figuras 9, 10 e 11).

Legenda: (A e B) 1, 5 e 6- Hepatoblastos; 2- Eritroblastos; 3- Formação de sinusóide; 4- Célula endotelial; 7- Micro região de células sanguíneas em processo de maturação. Coloração Hematoxilina-eosina. Barra = 20 μ m

Figura 10 – Fotomicrografias do broto hepático de embrião de rato F344 E13,5

Legenda: (A) Corte longitudinal do embrião com identificação do broto hepático. Barra = 500 µm. (B e C) Ampliação do broto hepático identificando as estruturas: 1, 2 e 7- Hepatoblastos; 3- Micro região de células sanguíneas em processo de maturação; 4- Sinusóide; 5 e 6- Células precursoras sanguíneas; 7 e 9- Formação de hepatócitos; 8- Células de Kupffer. Coloração: Picrosírius. Barra= 20 µm

Figura 11 – Fotomicrografias do broto hepático de embrião de rato F344 E14,5

Nos embriões E15,5 verifica-se uma maior distinção entre os cordões de hepatócitos em formação e os capilares sinusóides limitados pelos inúmeros cordões de hepatócitos que confluem para as chamadas veias centrolobulares. Os sinusóides possuem macrófagos, conhecidos como células de Kupffer. Células de Kupffer são encontradas na superfície luminal das células endoteliais (Figuras 11 e 12).

Legenda: (A) Identificação do fígado e do estômago (Et). Barra = 500 µm. (B) Identificação de três micro regiões de células sanguíneas (estrelas) em diferenciação no fígado. Barra = 20 µm. (C) Fígado ampliado identificando: 1 e 2- Células de Kupffer; 3- Hepatócito (binucleado); 4- Eritrócito; 5- Eritroblasto. Coloração: HE. Barra = 20 µm

Figura 12 – Fotomicrografias da cavidade abdominal e fígado de embrião de rato F344 E15,5

Dependendo da altura do corte longitudinal em E16,5 pode-se distinguir ramos da veia porta e veia centrolobular. Ramos da veia porta faz parte do espaço porta, o qual fica entre os lóbulos hepáticos. Nota-se também hepatócitos se organizando em cordões em sentido centrípeta a veia centrolobular (Figuras 13 e 14).

Legenda: Veia Centrolobular e ramos da veia porta. Coloração: HE. Barra = 200 μ m

Figura 13 – Fotomicrografia da cavidade abdominal e fígado de embrião de rato F344 E16,5

Legenda: 1- Veia centrolobular; 2 e 5- Eritrócito; 3 e 7- Células de Kupffer; 4- Sinusóide; 6- Células precursoras sanguíneas. Coloração: HE. Barra = 20 μ m

Figura 14 – Fotomicrografias do fígado de embrião de rato F344 E16,5 evidenciando hepatócitos se organizando em cordões

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Amostras aleatórias foram utilizadas nessa técnica. Foi possível identificar hepatoblastos adquirindo sua forma poliédrica em brotos hepáticos de fígados com E13,5 dias, sendo estes constituídos por um grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso em seu citoplasma (Figuras 15, 16 e 17).

Legenda: (n) núcleo de hepatoblasto, (r) retículo endoplasmático rugoso e (m) mitocôndria

Figura 15 – Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E13,5

Com o mesmo período gestacional (E13,5) hepatoblastos apresentaram-se possuindo suas superfícies de contato com a parede dos capilares sinusóides, através do espaço de Disse, e com a superfície de outros hepatoblastos (Figura 16).

Legenda: Hepatoblastos adjacentes e formação do espaço de Disse (seta). *Célula de Kupffer

Figura 16 – Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E13,5

Foi encontrado abundante presença de lisossomos no citoplasma de hepatoblastos, caracterizando degradação e renovação de organelas intracelulares. Foi visualizada a presença de células de Kupffer recobrindo as placas hepatocelulares (Figura 17).

Legenda: (a) retículo endoplasmático rugoso (rer) e vacúolo (v); (b) núcleo de hepatoblasto (n), retículo endoplasmático liso (rel) e lisossomos (seta 1); (c) hepatoblastos cercados por células de Kupffer, complexo de golgi (seta 2), vesículas eletrodensas (seta 3); (d) mitocôndrias (m)

Figura 17 – Eletromicrografias do fígado de embrião de rato F344 E13,5

Nos embriões E15,5 foi possível identificar hepatócitos, hepatoblastos e sinusóides (Figura 18)

Legenda: (A) 1- Sinusóide; 2- Hepatoblasto; (B-3, C e D) Hepatócitos

Figura 18 – Eletromicrografias do fígado de embrião de rato F344 E15,5 evidenciando hepatócitos se organizando em cordões

Aos 16,5 dias de período embrionário foi possível visualizar hepatócitos e suas estruturas citoplasmáticas (Figura 19).

Legenda: (n) núcleo; (C) – citoplasma; (seta) mitocôndrias

Figura 19 – Eletromicrografia do fígado de embrião de rato F344 E16,5 mostrando um hepatócito

5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi realizado análises imuno-histoquímicas em todas as fases embrionárias propostas, no entanto, sem “n” suficiente para validar estatisticamente os resultados.

5.5.1 Imuno-histoquímica para PCNA

O antígeno para proliferação celular (PCNA) obteve marcação positiva para todas as fases embrionárias estudadas conforme consta na figura 20.

Legenda: As figuras do broto hepático seguem com suas respectivas idades embrionárias. As setas representam a marcação positiva para proliferação celular. O fígado está delimitado em uma das fotomicrografias de 15,5 dias em pequeno aumento. Como controle positivo da reação foi usado o duodeno do animal

Figura 20 – Reação imuno-histoquímica para PCNA no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5

5.5.2 Imuno-histoquímica para células-tronco indiferenciadas hepáticas (Oct-4)

A marcação imuno-histoquímica para células-tronco de indiferenciadas hepáticas também foi realizada com o uso do anticorpo Oct-4. Dentre as idades avaliadas, o embrião E12,5 e E16,5 demonstrou ter pouca marcação em relação as demais idades embrionárias estudadas. Porém, sem validação estatística (Figura 21).

Legenda: As figuras do broto hepático seguem com suas respectivas idades embrionárias. As setas representam a marcação positiva para Oct-4. (C+) A formação da coluna vertebral dos mesmos animais foram utilizadas como controle positivo da reação

Figura 21 – Reação imuno-histoquímica para marcação de células-tronco indiferenciadas hepáticas (Oct-4) no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5

5.5.3 Imuno-histoquímica para Progranulina

A marcação imuno-histoquímica para progranulina ocorreu em todas as idades embrionárias estudadas conforme consta na Figura 22. No entanto, assim como na marcação de Oct-4 o embrião E12,5 obteve pouca reação com o antígeno.

Legenda: As figuras do broto hepático seguem com suas respectivas idades embrionárias. As setas representam a marcação positiva para progranulina

Figura 22 – Reação imuno-histoquímica para marcação de progranulina no fígado de embrião de rato F344 E12,5; 13,5; 14,5; 15,5; 16,5

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O interesse do desenvolvimento dos mamíferos antes do nascimento é enorme, em grande parte pela própria curiosidade sobre os primórdios da nossa formação e também pelo desejo de aumentar a qualidade de vida (MOORE; PERSAUD, 2004).

O desenvolvimento do embrião é um processo contínuo que se inicia quando um ovócito (óvulo) de uma fêmea é fertilizado por um espermatozóide de um macho. A divisão celular, a migração celular, a morte celular programada, a diferenciação, o crescimento e o rearranjo celular transformam o ovócito fertilizado (o zigoto) uma célula altamente especializada e totipotente, em um organismo humano multicelular. Embora a maior parte do desenvolvimento se realize durante os períodos embrionários e fetais, ocorrem mudanças importantes nos períodos posteriores do desenvolvimento: infância, adolescência e início da idade adulta. O desenvolvimento não termina ao nascimento. Depois dele ocorrem mudanças importantes além do nascimento como o grande aumento do peso do cérebro (MOORE; PERSAUD, 2004).

A embriologia do fígado inicia-se no momento em que surge o broto hepático, a partir do intestino primitivo. No que concerne à embriologia hepática, o embrião apresenta intestino primitivo, dividido pelo pedúnculo do saco vitelino, em porção cranial – intestino cefálico – e outra caudal – intestino caudal. O intestino primitivo é um tubo longo que se estende por todo o comprimento do embrião. Seus vasos sangüíneos são derivados de vasos que suprem o saco vitelínico. Entre o pedúnculo vitelino e o coração primitivo situa-se a placa mesodérmica, ou septo transversal, em cujo âmago se desenvolverá o fígado (PINOTTI, 1994; MOORE; PERSAUD, 2004).

Segundo Göttingen (2006), nos ratos, o desenvolvimento hepático se inicia no 10º dia de gestação (E10,5), o que se dá com uma conexão da endoderme do intestino anterior com o desenvolvimento do coração, sendo que no 12º dia de gestação o broto hepático encontra-se visível. Em nosso experimento, notamos que aos 11,5 dias de período embrionário o broto hepático é de difícil visualização, e por isso optamos por iniciar nossas análises aos 12,5 dias.

6.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DO EMBRIÃO

A embriologia do parênquima inicia-se pelo surgimento do broto hepático. O epitélio endodérmico da face anterior do intestino primitivo, logo acima do saco vitelino, sofre espessamento por rápida proliferação celular, constituindo pequeno divertículo, o divertículo hepático, que penetra no septo transversal situado entre a cavidade pericárdica e o pedúnculo do saco vitelino (PINOTTI et al., 1994).

Achados de estudos sugerem que o divertículo hepático e o broto ventral do pâncreas se desenvolvem a partir de duas populações celulares do endoderma. Fatores de crescimento de fibroblastos (*Fibroblast growth factor* - FGF), secretados em níveis suficientes pelo coração em desenvolvimento, interagem com células bipotenciais e induzem a formação do divertículo hepático. O divertículo hepático é a manifestação de uma série de processos indutivos já em andamento (CARLSON, 1996; MOORE; PERSAUD, 2004).

Aos 12,5 dias os embriões de rato F344 de nosso experimento apresentaram evidências do broto hepático, porém ainda na fase inicial de desenvolvimento. Mesmo assim foi possível visualizar dois segmentos hepáticos conhecido em conjunto como broto hepático, estrutura precursora do futuro fígado.

O divertículo hepático divide-se logo em dois componentes: a *pars hepática* (broto hepático também conhecido como primórdio do fígado) que são células endodérmicas que dão origem aos cordões entrelaçados de células hepáticas do parênquima e as células de revestimento dos ductos biliares intra-hepáticos e uma parte caudal, a *pars cystica*, que vai formar a vesícula biliar e o ducto cístico (PINOTTI et al., 1994; MOORE; PERSAUD, 2004).

Na *pars hepática*, Os cordões hepáticos se anastomosam em torno de espaços revestidos por endotélio, os primórdios dos sinusóides hepáticos. O tecido fibroso, o

tecido hematopoiético e as células de Kupffer são derivados do mesênquima do septo transversal (MOORE; PERSAUD, 2004).

Com o crescimento na espessura do septo transversal, os cordões hepáticos epiteliais endodérmicos imbricam-se profusamente com os seios nervosos que aí se desenvolvem, provenientes das veias vitelinas e umbilicais, dando origem, assim, às trabéculas de hepatócitos e aos sinusóides, respectivamente. De início as trabéculas são mais espessas, tornando-se mais simples com o desenvolvimento do embrião (MORGAN; HARTROFT, 1961; PINOTTI et al., 1994).

O mesoderma do septo transversal, que envolve o fígado, diferencia-se posteriormente na cápsula de Glisson, bem como origina todo tecido conectivo hepático (PINOTTI et al., 1994).

Na *pars cystica*, uma pequena porção do divertículo hepático origina a vesícula, e o pedículo do divertículo forma o ducto cístico (MOORE; PERSAUD, 2004).

De início, as vias biliares extra-hepáticas são obstruídas por células epiteliais, sofrendo posteriormente processo de recanalização devido à vacuolização resultante da degeneração dessas células. O pedículo que liga os canais cístico e hepático ao duodeno transforma-se no ducto biliar. Inicialmente, este ducto se prende à face ventral da alça duodenal; entretanto, como o duodeno cresce e roda, a entrada do ducto biliar é levada para face dorsal do duodeno. Em humanos, os pigmentos hepáticos passam a serem formados a partir da 13ª até a 16ª semana e passam a ser lançados no duodeno, dando ao seu conteúdo (mecônio) uma cor verde-escura (JUNQUEIRA; ZAGO, 1982; MOORE; PERSAUD, 2004).

O bloqueio dos ductos bilíferos resulta da falta de sua recanalização, após a etapa sólida de seu desenvolvimento. Esta grave malformação resulta de falta de vascularização dos ductos, causando infecção hepática durante o período fetal (MOORE, 1988).

A forma do fígado é estabelecida muito cedo, em humanos a partir do embrião de 18 mm uma primeira depressão dorsal é criada pelo estômago em desenvolvimento. O

fígado cresce rapidamente e, da quinta a décima semana, ocupa uma grande porção da cavidade abdominal superior. À medida que ele cresce e se desloca para a esquerda, a impressão gástrica se aprofunda e se move no mesmo sentido, reduzindo o espaço para habitação da metade esquerda hepática que toma forma de cunha. A quantidade de sangue oxigenado que flui da veia umbilical para o fígado determina o seu desenvolvimento e sua segmentação funcional. Inicialmente, os lobos direito e esquerdo são aproximadamente do mesmo tamanho, porém o direito logo se torna maior (ELIAS; SHERRICK, 1969; MOORE; PERSAUD, 2004). Nos animais do presente experimento, o fígado se desenvolve aumentando de volume e subdividindo-se em lóbulos hepáticos aos E14,5 dias. Distingue-se 4 lobos hepáticos bem evidenciados. Aos 15,5 e 16,5 dias os embriões já possuem fígados mais bem desenvolvidos, com aspectos anatômicos semelhantes ao fígado maduro, permitindo até mesmo seu isolamento com maior facilidade com o auxílio de instrumental microcirúrgico.

6.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EMBRIÃO

Segundo Gottingen (2006), em ratos durante E9,5 e 10,5 fatores de transcrição ativam genes hepáticos específicos que regulam a hepatogênese. Em nossos resultados verificamos que em E12,5 pode-se visualizar o 4º ventrículo encefálico, mesencéfalo, prosencéfalo, início da cavidade nasal, coração com divisão atrial e ventricular e o neuroporo caudal. De acordo com Monie (1976), as últimas porções abertas do tubo neural são os neuroporos anterior e posterior que nos homens fecham em torno de 25 a 27 dias e nos ratos fecham em torno de 10,5 a 11 dias.

Lima (2007) encontrou primórdios hepáticos em embriões de bovinos com 20 dias de idade gestacional (CR: 9,5 mm), descrevendo-os como cordões entrelaçados de células hepáticas e pequenos sinusóides com células sanguíneas em seu interior. O CR de 9,5 mm em bovinos com 20 dias correlaciona-se em nossos estudos com o período gestacional de E13,5 em ratos F344 com CR de $9,30 \pm 0,43$ mm. Nessa mesma idade gestacional os embriões também apresentaram medula espinhal, presença das vesículas encefálicas (prosencefalo, mesencéfalo e rombencéfalo),

somitomitos (que darão origem às vértebras, costelas e musculatura axial) (MOORE; PERSAUD, 2003), formação mandibular, cavidade nasal, coração com cavidade divisão atrial e ventricular.

O broto hepático é mais visível aos 14,5 dias nos ratos F344, iniciando-se uma comunicação entre os brotos no período de 15,5 e 16,5 dias. Assim, o fígado embrionário torna-se o maior órgão em proporções se comparado ao tamanho total do embrião.

O fígado surge do intestino anterior por meio de uma invaginação ventral da porção caudal do mesmo e a partir desse primeiro broto hepático uma massa de mesoderma esplâncnico invade o septo transversal entre coração e intestino médio crescendo rapidamente desde a 5ª até a 10ª semana em embriões humanos. Sendo assim o divertículo hepático cresce rapidamente e divide-se em duas partes; das células endodérmicas se originarão os cordões entrelaçados de células hepáticas e o epitélio de revestimento da porção intra-hepática; nessa fase os cordões se anastomosam em torno dos primeiros espaços revestidos por epitélio e formam os primeiros sinusóides hepáticos (NODEN; DE LAHUNTA, 1990; MOORE; PERSAUD, 2004). Acreditamos que esse desenvolvimento ocorra da mesma forma nos ratos F344, porém, em tempos diferentes de acordo com a idade gestacional uma vez que todas as estruturas embrionárias citadas estão presentes nos animais em estudo.

Aos 15,5 dias de período embrionário, foram identificados a presença dos membros torácicos na região torácica e dos pélvicos, na pélvica, rombencéfalo sinalizando a presença das vesículas encefálicas (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), olho, pulmão, rim, intestino e fígado. Neste mesmo período (E15,5) o fígado aumenta de volume consideravelmente na cavidade abdominal, tornando-se mais evidente aos 16,5 dias, onde, além das estruturas já mencionadas anteriormente, possui também olhos mais desenvolvidos.

Em estudos com embriões de ratos entre os estágios de 15 e 19 dias de gestação, Theiler (1972) relata que os mesmos, esboçam como características embrionárias a presença do neuróporo cranial ainda aberto, os arcos branquiais são visíveis com os seus sulcos delimitando cada arco, a presença dos brotos dos membros em forma

de “remo”. Relata ainda, a presença das vesículas encefálicas, bem como a presença da vesícula óptica, da fosseta nasal e dos somitos individualizados, fatos esses corroborados até o momento nos períodos gestacionais analisados em nossos estudos.

6.2.1 Avaliação Microscópica do Fígado (Broto Hepático)

Assim como obtido em nossos resultados, Fausto (1994) já descreve que em ratos e humanos os hepatoblastos localizam-se próximos ao espaço porta ou a grandes espaços vasculares. Estas células inicialmente são pequenas estruturalmente e assemelham-se funcionalmente a hepatócitos ou células do ducto-biliar (GRISHAM; THORGEIRSSON, 1997). Os hepatoblastos expressam citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19, mas a expressão destas proteínas decresce progressivamente durante a gestação (SHIOJIRI; LEMIRE; FAUSTO, 1991).

Os brotos hepáticos de embriões entre E12,5 e E14,5 dias de idade gestacional apresentaram-se com um grande aglomerado de hepatoblastos circundados por células precursoras sanguíneas em diferenciação, e cercados por uma fina camada serosa. Os hepatoblastos possuem núcleo grande, basofílico e escasso citoplasma.

Nos embriões E12,5 e E13,5 dias, os hepatoblastos são menores em tamanho que os próprios eritroblastos. A partir de 14,5 estão presentes hepatoblastos se diferenciando em hepatócitos, apesar da difícil identificação. Nos embriões E15,5, verifica-se uma maior distinção entre os cordões de hepatócitos em formação e os capilares sinusóides limitados por cordões de hepatócitos que confluem para as chamadas veias centrolobulares. Os espaços entre os hepatócitos contêm capilares e sinusóides hepáticos. Os sinusóides possuem macrófagos, conhecidos como células de Kupffer que são encontradas na superfície luminal das células endoteliais. Além dos hepatoblastos, ZVIBEL e colaboradores (2006) relataram que o fígado fetal de ratos contém células-tronco ovais. As células ovais são consideradas uma progênie de células hepáticas (GRISHAM; THORGEIRSSOM, 1997). As células ovais desenvolvem-se próximas às células estreladas, sendo ativadas em resposta a

processos inflamatórios (DABEVA; SHAFRITZ, 2003). Sugere-se que as células ovas residem à medula óssea e posteriormente migram para o fígado, as quais se tornam hepatócitos (ZVIBEL, 2006). As células ovas ativadas expressam marcadores para células epiteliais biliares (CK 7, 8, 18 e 19, OV-6 e conexina 43), marcadores para hepatoblastos fetais (AFP, CGT M2-PK), marcadores de células-tronco hematopoiéticas (Thy-1, c-kit, CD34) e marcadores específicos de células neuroepiteliais (*N-CAM*) (ALISON, 1996). Fenotipicamente as células ovas assemelham-se aos hepatoblastos fetais (DABEVA; SHAFRITZ, 2003). No entanto, nesse experimento não utilizado nenhum marcador para confirmação desse dado.

6.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Todos os dados da técnica de microscopia eletrônica de transmissão são inéditos uma vez que ainda não foi relatado nada acerca do broto hepático de embriões de ratos F344 nessas idades gestacionais. Portanto, identificamos ultraestruturas básicas do fígado com hepatócitos, hepatoblastos, células de Kupffer, sinusóides, espaço de Disse e organelas em várias idades embrionárias. Em todas elas as estruturas foram descritas conforme consta na literatura embriológica em humanos, uma vez que a morfologia seguia os mesmos padrões.

6.2.3 Avaliação Imuno-Histoquímica do Fígado (broto hepático)

Foram realizados três ensaios imuno-histoquímicos: PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular); Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*, marcador de células-tronco embrionárias indiferenciadas); e progranulina. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em todas as idades embrionárias propostas por nosso trabalho, sendo que houve expressão dos três marcadores no tecido hepático de todas as idades embrionárias, com exceção de Oct-4 para E12,5 e 16,5 e progranulina para a idade E12,5, que foram escassas.

As marcações ocorreram homoganeamente em todo o tecido e atingindo consequentemente vários tipos celulares. Porém ficamos limitados a não aprofundar muito em nossas análises tendo em vista que o “n” utilizado para este método não foi suficiente para validar uma possível quantificação de células marcadas positivamente pelos antígenos.

Conforme esperado, o anticorpo anti-PCNA foi altamente expresso em todas as fases embrionárias, uma vez que o embrião está se desenvolvendo e que, para isto, é necessário a proliferação de células para a formação dos tecidos, órgãos e sistemas. Sabendo-se que a progranulina é um fator de crescimento que também atua como indutor da proliferação celular (DANIEL et al., 2003), era esperado que no decorrer dos dias de crescimento do embrião de F344 os picos de proliferação celular e de progranulina permanecessem em sincronia e com crescente expressão. Sendo assim, possivelmente a progranulina atue na indução da proliferação celular do fígado em desenvolvimento.

Os resultados da expressão por imuno-histoquímica da progranulina, mostraram positividade entre E12,5 e E16,5, obtendo pouca reação com o antígeno em E12,5. Já os resultados de Oct-4 mostraram positividade entre E13,5 e E15,5, diferindo dos demais anticorpos por não apresentar positividade em E16,5. Sendo assim, as células encontradas no fígado em desenvolvimento durante esse período gestacional estariam já, em sua grande maioria, diferenciadas em hepatócitos. Estes resultados encontrados nos estudos de imuno-histoquímica sugerem que exista uma relação entre células-tronco indiferenciadas hepáticas – progranulina - proliferação celular entre o período embrionário. A hipótese seria que a progranulina estimularia a proliferação celular das células precursoras hepáticas do broto hepático desde E12,5, entretanto, mais ativamente entre E13,5-16,5. Como a positividade para Oct-4 ocorreu até o E15,5, sugere-se que a progranulina também esteja atuando na diferenciação celular dos hepatoblastos em hepatócitos entre E15,5 e E16,5, uma vez que já foi descrito que a progranulina atua em processos de diferenciação (SUZUKI et al, 2000) e desenvolvimento embrionário (DANIEL et al., 2003; DIAZ-CUETO et al., 2000).

A ação da progranulina ainda está sendo bastante estudada e por ser um fator de crescimento descoberto recentemente, as informações sobre este fator ainda são escassas. Sabe-se, no entanto, que a progranulina pode ser encontrada no fígado de ratos cirróticos, intestino, células carcinogênicas hepáticas, hipotálamo, fase embrionária e neonatal, e pode estar envolvida em processos de regeneração, proliferação e sobrevivência celular, processos inflamatórios, e até mesmo tumores (ROTSTEIN et al., 1988; SORIANO et al., 1995; TRAUTWEIN et al., 1996; SUZUKI et al., 2000; KIEMER; TAKEUCHI; QUINLAN, 2001; HE; BATEMAN, 2003; SCHWABE et al., 2003; YASUAKI; CHIHRO, 2005; GUERRA et al., 2007, 2009).

Recentemente o fígado ganhou destaque nas pesquisas com células-tronco pela sua alta capacidade proliferativa e regenerativa (FAUSTO, 1994). Porém a capacidade regenerativa por meio de transplante ponte (transplante de células) com células maduras diferenciadas (hepatócitos) é limitada devido à falta de doadores e pela lenta proliferação dessas células *in vitro*, sendo as células-tronco precursoras de hepatócitos aparecem como uma saída (FAUSTO, 1994; GRISHAM; THORGEIRSSON, 1997). Para tanto, o desafio atual é identificar metodologias que promovam a diferenciação dessas células-tronco em linhagens adultas específicas e funcionais (SPENCE; WELLS, 2007).

Partindo da premissa, observada no presente estudo, de que a progranulina atuaria nos processos de proliferação celular e diferenciação das células-tronco do broto hepático, poderíamos usá-la como um fator de diferenciação em culturas *in vitro* visando a diferenciação de células-tronco do broto hepático em hepatócitos funcionais para a terapia celular. Dessa forma, nosso estudo contribuiria com as pesquisas que abrangem a regeneração hepática, entretanto mais estudos são necessários para se comprovar essa utilização.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados pode-se concluir que:

A progranulina pode ser utilizada em protocolos de diferenciação de células-tronco do broto hepático em hepatócitos pelas suas funções de estimular a proliferação celular e de diferenciação, entretanto mais estudos devem ser realizados para confirmar tal aplicação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALISON, M.R.; GOLDING, M.H.; SARRAF, C. E. Pluripotence liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. **Cell Proliferation**, v. 29, n. 7, p. 373-402, 1996
- ANAKWE, O. O.; GERTON, G. L. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 42, n. 2, p. 317-328, 1990.
- BABA, T.; HOFF, H. B. III; NEMOTO, H.; LEE, H.; ORTH, J.; ARAI, Y.; GERTON, G. L. Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth modulating peptides, granulins and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 3, p. 233-243, 1993.
- BADVE, S.; LOGDBERG, L.; SOKHI, R.; SIGAL, S. H.; BOTROS, N.; CHAE, S.; DAS, K. M.; GUPTA, S. An antigen reacting with das-1 monoclonal antibody is ontogenetically regulated in diverse organs including liver and indicates sharing of developmental mechanisms among cell lineages. **Pathobiology**, v. 68, n. 2, p. 76-86, 2000.
- BAHARVAND, H.; HASHEMI, S. M.; KAZEMI ASHTIANI, S.; FARROKHI, A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. **International Journal of Developmental Biology**, v. 50, n. 7, p. 645-652, 2006.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. S. **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1996. 235 p.
- BATEMAN, A.; BENNETT, H. Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors. **Journal of Endocrinology**, v. 158, n. 2, p. 145-151, 1998.
- BISGAARD, H. C.; TON, P. T.; NAGY, P.; THORGEIRSSON, S. S. Phenotypic modulation of keratins, vimentin, and alpha-fetoprotein in cultured rat liver epithelial cells after chemical, oncogene, and spontaneous transformation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 159, n. 3, p. 485-494, 1994.
- CAI, J.; ZHAO, Y.; LIU, Y.A.; YE, F.; SONG, Z.; QIN, H.; MENG, S.; CHEN, Y.; ZHOU, R.; SONG, X.; GUO, Y.; DING, M.; DENG, H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1229-1239, 2007.
- CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996, p. 408.
- CHEUNG, S. T.; WONG, S. Y.; LEUNG, K. L.; CHEN, X.; SO, S.; NG, I.O.; FAN, S.T. Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of

hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 22, p. 7629-7693, 2004.

COSTA, R. H.; KALINICHENKO, V. V.; HOLTERMAN, A. X.; WANG, X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. **Hepatology**, v. 38, n. 6, p. 1331-1347, 2003.

DABEVA, M. D.; SHAFRITZ, D. A. Hepatic stem cell and liver repopulation. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, p. 349-361, 2003.

DANIEL, R.; HE, Z.; CARMICHAEL, K. P.; HALPER, J.; BATEMAN, A. Cellular localization of gene expression for progranulin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 999-1009, 2000.

DANIEL, R.; DANIELS, E.; HE, Z.; BATEMAN, A. Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. **Developmental Dynamics**, v. 227, n. 4, p. 593-599, 2003.

DIAZ-CUETO, L.; STEIN, P.; JACOBS, A.; SCHULTZ, R. M.; GERTON, G. L. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). **Developmental Biology**, v. 217, n. 2, p. 406-418, 2000.

DONALD, C. D.; LADDU, A.; CHANDHAM, P.; LIM, S.D.; CHOEN, C.; AMIN, M.; GERTON, G. L.; MARSHALL, F. F.; PETROS, J. A. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. **Anticancer Research**, v. 21, n. 6A, p. 3739-3742, 2001.

DUNCAN, S. A. Mechanisms controlling early development of the liver. **Mechanism of Development**, v. 120, n. 1, p.19-33, 2003.

DUNCAN, S. A. Transcriptional regulation of the liver development. **Developmental Dynamics**, v. 219, n. 2, p. 131-142, 2000.

DUNCAWOODIE, S. L.; RODRIGUEZ, T. A.; BEDDINGTON, R. S. P. Msg1 and Mrg1, founding members of a gene family, show distinct patterns of gene expression during mouse embryogenesis. **Mechanism of Development**, v. 72, n. 1-2, p. 27-40, 1998.

ELIAS, H.; SHERRICK, J. C. **Morphology of the liver**. New York, Academic Press, 1969, p. 233-261.

EVANS, H. E.; SACH, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomy, Histology and Embryology**, v. 2, p. 11-45, 1973.

FAUSTO, N. **Liver stem cells**. In: I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D. Schachter and D.A. Shafritz, Editors, *The Liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press: New York, p. 1501-1518, 1994.

- GOTTINGEN, G. **Characterization of foetal hepatic cells during rat liver development**. 2006. Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu vorgelegt von Abderrahim Elmaouhoub Aus Rabat, Marokko, 2006.
- GRAPIN-BOTTON, A. Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2-3, p. 335-347, 2005.
- GRISHAM, J. W.; THORGEIRSSON, S. S. **Liver stem cells**. In: PottenCS, ed. *Stem Cells*. New York: Academic Press, p. 233–282, 1997.
- GUERRA, R. R.; KRIAZHEV, L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; BATEMAN, A. Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. **Growth Factor**, v. 25, n. 4, p. 280-285, 2007.
- GUERRA, R. R.; TROTTA, M. R.; PARRA, O. M.; AVANZO, J. L.; BATEMAN, A.; ALOIA, T. P. A.; DAGLI, M. L. Z.; BLAZQUEZ, F. J. H. Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in thioacetamide-induced liver cirrhoses in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 11, p. 1027-1034, 2009.
- HE, Z.; ISMAIL, A.; KRIAZHEV, L.; SADVAKASSOVA, G.; BATEMAN, A. Progranulin (PC cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. **Cancer Research**, v. 62, n. 19, p. 5590-5596, 2002.
- HE, Z.; BATEMAN, A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. **Cancer Research**, v. 59, n. 13, p. 3222-3229, 1999.
- HE, Z.; BATEMAN, A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 10, p. 600-612, 2003.
- JONES, M. B.; MICHENER, C. M.; BLANCHETTE, J. O.; KUZNETSOV, V. A.; RAFFELD, M.; SERRERO, G.; EMMERT-BUCK, M. R.; PETRICIOIN, E. F.; KRIZMAN, D. B.; LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The granulin-epithelin precursor/PC-cell derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 44-51, 2003.
- JUNQUEIRA, L. C. U. Histology revisited. Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding - Ciência e Cultura - **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 47, p. 92-95, 1995.
- JUNQUEIRA, L. C.; ZAGO, D. **Embriologia médica e comparada**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1982, p. 291.
- KAUFMAN, M. H.; BARD, J. B. L. **The Anatomical Basis of Mouse Development**. 1. ed. New York: Academic Press. 1999. 291 p.

- KIEMER, A. K.; TAKEUCHI, K.; QUINLAN, M. P. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. **Oncogene**, v. 20, n. 46, p. 6679-6688, 2001.
- KIYOTA, A.; MATSUSHITA, T.; UEOKA, R. Induction and high density culture of human hepatoblasts from fetal hepatocytes with suppressing transformation. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 2308-2311. 2007.
- LIAU, L. M.; LALLONE, R. L.; SEITZ, R. S.; BUZNIKOV, A.; GREGG, J. P.; KORNBLUM, H. I.; NELSON, S. F.; BRONSTEIN, J. M. Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption. **Cancer Research**, v. 60, n. 5, p.1353-1360, 2000.
- LIMA, E. B. **Estudo do desenvolvimento do aparelho digestório de embriões bovinos (*Bos indicus* e *Bos taurus*) durante o período gestacional compreendido entre 10 e 60 dias**. 2007. 73 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- LU, H.; WANG, Z.; ZHENG, Q.; LI, J. H.; CHONG, X. Q.; XIAO, S. D. Efficient differentiation of newly derived human embryonic stem cells from discarded blastocysts into hepatocyte-like cells. **Journal of Digestive Diseases**, v. 11, n. 6, p. 376-382, 2010.
- LU, R.; SERRERO, G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth factor (PCDGF/granulin precursor). **Proceedings National Academy Sciences of USA**, v. 98, n. 1, p. 142-147, 2001.
- LU, R.; SERRERO, G. Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 256, n. 1, p. 204-207, 1999.
- LU, R.; SERRERO, G. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. **Proceedings National Academy Sciences of USA**, v. 97, n. 8, p. 3993-3998, 2000.
- MCLIN, V. A.; ZORN, A. M. Molecular control of liver development. **Clinics in Liver Disease**, v. 10, n. 1, p. 1-25, 2006.
- MONIE, I. W. Comparative development of the nervous, respiratory, and cardiovascular systems. **Environ Health Perspect**, v. 18, p. 55-60, 1976.
- MOORE, K. L. **Fundamentos de embriologia humana**. São Paulo: Ed. Manole, 1988, p. 194.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **The developing human, clinically oriented embryology**. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 609 p.

MORGAN, J. D.; HARTROFT, W. S. Juvenile liver age at which one cell thick plates predominate in the human liver. **Archives of Pathology**, v. 71, p. 86-88, 1961.

MURACA, M.; GERUNDA, G.; NERI, D.; VILEI, M. T.; GRANATO, A.; FELTRACCO, P.; MERONI, M.; GIRON, G.; BURLINA, A. B. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. **The Lancet**, v. 359, n. 9303, p. 317-318, 2002.

NODEN, D.; M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los animales domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1990.

NYAMATH, P.; ALVI, A.; HABEEB, A.; KHOSLA, S.; KHAN, A. A.; HABIBULLAH, C. M. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver using CD34 as a hepatic progenitor marker. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 16, p. 2319-2323, 2007.

PAN, C. X.; KINCH, M. S.; KIENER, P. A.; LANGERMANN, S.; SERRERO, G.; SUN, L.; CORVERA, K.; SWEENEY, C. J.; LI, L.; ZHANG, S.; BALDRIDGE, L. A.; JONES, T. D.; KOCH, M. O.; ULBRIGHT, T. M.; EBLE, J. N.; CHENG, L. PC CELL-derived growth factor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 4, p. 1333-1337, 2004.

PARK, L-K.; LEE, D-H. Bioartificial liver systems: current status and future perspective. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 99, p. 311-319, 2005.

PARVIZ, F.; MATULLO, C.; GARRISON, W. D.; SAVATSKI, L.; ADAMSON, J. W.; NING, G.; KAESTNER, K. H.; ROSSI, J. M.; ZARET, K. S.; DUNCAN, S. A. Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the developmental of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. **Nature Genetics**, v. 34, n. 3, p. 292-296, 2003.

PINOTTI, H. W. **Tratado de clínica cirúrgica do aparelho digestivo**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1994, p. 1322.

PLOWMAN, G. D.; GREEN, J. M.; NEUBAUER, M. G.; BUCKLEY, S. D.; MCDONALD, V. L.; TODARO, G. J.; SHOYAB, M. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. **Journal of Biological and Chemistry**, v. 267, n. 18, p. 13073-13078, 1992.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 13, p. 1918-1934, 2005.

QU, X.; LAM, E.; DOUGHMAN, Y. Q.; CHEN, Y.; CHOU, Y. T.; LAM, M.; TURAKHIA, M.; DUNWOODIE, S. L.; WATANABE, M.; XU, B.; DUNCAN, S. A.; YANG, Y-C. Cited2, a coactivator of HNF4 α , is essential for liver development. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 21, p. 4445-4456, 2007.

RHEE, J.; INOUE, Y.; YOON, J. C.; PUIGSERVER, P.; FAN, M.; GONZALEZ, F. J.; SPIEGELMAN, B. Regulation of hepatic fasting response by PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 α in

gluconeogenesis. **Proceedings National Academy Sciences of USA**, v. 100, n. 7, p. 4012-4017, 2003.

ROSSANT, J.; TAM, P. P. **Mouse development: patterning, morphogenesis, and organogenesis**. 1. ed. San Francisco: Academic Press. 2002. 736 p.

ROTSTEIN, O. D.; FIEGEL, V. D.; SIMMONS, R. L.; KNIGHTON, D. R. The deleterious effect of reduced pH and hypoxia on neutrophil migration in vitro. **Journal of Surgical Research**, v. 45, n. 3, p. 298–303, 1988.

SANGAN, C. B.; TOSH, D. Hepatic progenitor cells. **Cell and Tissue Research**, v. 342, n. 2, p. 131-137, 2010.

SCHWABE, R. F.; BRADHAM, C. A.; UEHARA, T.; HATANO, E.; BENNETT, B. L.; SCHOONHOVEN, R.; BRENNER, D. A. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. **Hepatology**, v. 37, p. 824-832, 2003.

SELDEN, C.; HODGSON, H. Cellular therapies for liver replacement. **Transplant Immunology**, v. 12, n. 3-4, p. 273-288, 2004.

SHIOJIRI, N.; LEMIRE, J. M.; FAUSTO, N.. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. **Cancer Research**, v. 51, p. 2611-2620, 1991.

SORIANO, H. E.; BILYEU, T. A.; JUAN, T. S.; ZHAO, W.; DARLINGTON, G. J. DNA binding by C/EBP proteins correlates with hepatocyte proliferation. **In Vitro Cellular Developmental Biology Animal**, v. 31, n. 9, p. 703-709, 1995.

SOTO-GUTIERREZ, A.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; ZHAO, D.; RIVAS-CARRILLO, J. D.; LEBKOWSKI, J.; TANAKA, N.; FOX, I. J.; KOBAYASHI, N. Differentiation of mouse embryonic stem cells to hepatocyte-like cells by co-culture with human liver nonparenchymal cell lines. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 347-356, 2007.

SPENCE, J. R.; WELLS, J. M. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 12, p. 3218-3227, 2007.

SUZUKI, M.; BANNAI, M.; MATSUMURO, M.; FURUHATA, Y.; IKEMURA, R.; KURANAGA, E.; KANEDA, Y.; NISHIHARA, M.; TAKAHASHI, M. Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. **Physiology Behavior**, v. 68, p. 707-713, 2000.

SUZUKI, M.; YOSHIDA, S.; NISHIHARA, M.; TAKAHASHI, M. Identification of a sexsteroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**, v. 242, n. 3, p. 127-130, 1998.

TANGKEANGSIRISIN, W.; HAYASHI, J.; SERRERO, G. PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, n. 5, p. 1737-1743, 2004.

TERAMOTO, K.; ASAHINA, K.; KUMASHIRO, Y.; KAKINUMA, S.; CHINZEI, R.; SHIMIZU-SAITO, K.; TANAKA, Y.; TERAOKA, H.; ARII, S. Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, v. 12, p. 196–202, 2005.

THEILER, K. **The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age**. New York: Springer Verlag, 1972.

THONSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic Stem Cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TRAUTWEIN, C.; RAKEMANN, T.; PIETRANGELO, A.; PLUMPE, J.; MONTOS, G.; MANNS, M. P. C/EBP-beta/LAP controls down-regulation of albumin gene transcription during liver regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22262-22270, 1996.

WALLINGTON, E. A. **Histology methods for bone**. London: Butterworths, 1972.

WATT, A. J.; GARRISON, W. D.; DUNCAN, S. A. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. **Hepatology**, v. 37, p. 1249-1253, 2003.

WITHINGTON, S. L.; SCOTT, A. N.; SAUNDERS, D. N.; LOPES F. K.; PREIS, J. I.; MICHALICEK, J.; MACLEAN, K.; SPARROW, D. B.; BARBERA, J. P.; DUNWOODIE, S. L. Loss of Cited2 affects trophoblast formation and vascularization of the mouse placenta. **Developmental Biology**, v. 294, n. 1, p. 67-82, 2006.

XU, S. Q.; TANG, D.; CHAMBERLAIN, S.; PRONK, G.; MASIARZ, F. R.; KAUR, S.; PRISCO, M.; ZANOCCO-MARANI, T.; BASERGA, R. The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 32, p. 20078-20083, 1998.

YASUAKI, T.; CHIHIRO, S. Immunotherapy for hepatic cancer with sabaibin, an apoptosis supressing factor, as the target. **Minophagen. Medical Review**, v. 3, n. 50 p. 176-179, 2005.

ZANICHELLI, M. A.; FURRER, A. A.; FILHO, T. S. P.; VAZ, F. A. C. Hematopoeise, Fatores de Crescimento e Aplicação Clínica da Eritropoetina na Anemia da Prematuridade. **Pediatria**. v. 17, n. 3, p. 126-142, 1995.

ZANOCCO-MARANI, T.; BATEMAN, A.; ROMANO, G.; VALENTINIS, B.; HE, Z-H.; BASERGA, R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. **Cancer Research**, v. 59, n. 20, p. 5331-5340, 1999.

ZARET, K. S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. **National Reviews Genetic**, v. 3, n. 7, p. 499-512, 2002.

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

ZHOU, J.; GAO, G.; CRABB, J. W.; SERRERO, G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 15, p. 10863-10869, 1993.

ZHOU, Qing-Jun; HUANG, Yan-Dan; XIANG, Li-Xin; SHAO, Jian-Zhong; ZHOU, Guo-Shun; HANG, Yao; DAI, Li-Cheng; LU, Yang-Liang. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes induced by fibroblast growth factors and morphological protein-4. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1714-1721, 2007.

ZVIBEL, I.; BRONSTEIN, M.; HUBEL, E.; BAR-LEV, E.; HALPERN, Z.; OREN, R. Isolation, characterization and culture of Thy1-positive cells from fetal rat livers. **World Journal of Gastroenterology**. v. 28, n 12, p. 3841-3847, 2006.