

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

# Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias humanas

Madellon Melo de Assis

Rio de Janeiro

2017

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Madellon Melo de Assis

Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias  
humanas

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de  
Mestrado Profissional em Pesquisa  
Biomédica da Universidade Federal  
do Rio de Janeiro visando à  
obtenção do grau de Mestre em  
Pesquisa Biomédica.

Orientadoras: Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Tais Hanae Kasai Brunswick

Rio de Janeiro

2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Assis, Madellon Melo de

Geração de Hepatócitos a partir de Células-Tronco Embrionárias Humanas / Madellon Melo de Assis. - Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2017.

xvi; 64 f. : il. ; 31 cm.

Orientadoras: Regina Coeli dos Santos Goldenberg e Tais Hanae Kasai Brunswick.

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica, 2017.

Referências bibliográficas: f. 55-61.

1. Técnicas de Cultura de Células. 2. Técnicas in vitro. 3. Hepatócitos. 4. Diferenciação Celular. 5. Células-Tronco Pluripotentes. 6. Células-Tronco Embrionárias Humanas. 7. Pesquisa Biomédica - Tese. I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Brunswick, Tais Hanae Kasai. III. UFRJ, IBCCF, Programa de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica. IV. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no LABORATÓRIO DE CARDIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR do INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro com auxílio das entidades: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério da Saúde. Contou ainda com a colaboração do Centro

Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Madellon Melo de Assis

### **Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias humanas**

Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Biomédica.

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2017.

---

Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges (UFRJ) – Coordenador do curso de Pós-graduação em Formação para Pesquisa Biomédica

---

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg (UFRJ) – Orientadora

---

Prof. Dra. Tais Hanae Kasai Brunswick (UFRJ) – Orientadora

---

Prof. Dra. Tânia Maria Ruffoni Ortiga (UFRJ) – Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Pedro Moreno Pimentel Coelho (UFRJ) – Banca Examinadora

---

Dra. Karina Dutra Asensi (UFRJ) – Banca Examinadora

---

Dra. Danúbia Silva dos Santos (UFRJ) – Revisora e suplente interna

---

Prof. Dr. Rafael Soares Lindoso (UFRJ) – Suplente externo

*“Somos todos irmãos, não porque tenhamos o mesmo berço, o mesmo sobrenome: temos o mesmo trajeto de sanha e fome.”*

Ferreira Gullar

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me proporcionar encontros maravilhosos ao longo dessa jornada.

Ao meu marido Leonardo, pelo amor e carinho de sempre. E pela paciência e compreensão da importância desta etapa para a minha vida.

Aos meus pais, Márcia e José Henrique (*in memoriam*) pelo esforço desde a infância para que eu e meus irmãos tivéssemos a oportunidade de estudar.

A minha família, pelo incentivo e amor durante a caminhada.

A minha madrinha Lucia Helena, pela amizade, incentivo e generosidade.

Aos meus amigos, pela alegria, entusiasmo e reposição das minhas energias. Sem vocês seria impossível.

Aos companheiros de trabalho e de luta da UERJ que mantiveram minha sanidade mental e ânimo diante das desafiadoras circunstâncias pelas quais estamos passando.

A minha eterna professora Maria Helena Nicola, que me encantou com seus conhecimentos aos dezesseis anos de idade e me despertou o interesse pela ciência.

Aos companheiros do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular pela parceria e trocas de experiências. Registro minha gratidão especial a Lanuza e ao Victor. É impossível descrever o quanto me senti acolhida por vocês, somos uma equipe.

Aos professores Adriana Bastos Carvalho e Antonio Carlos Campos de Carvalho por me receberem no LCCM e por repartirem seus conhecimentos.

As minhas orientadoras Regina e Tais, por acreditarem em mim, pelo carinho, competência e compreensão dos meus horários caóticos de trabalho e

apresentações de dados. Espero que nossos caminhos se cruzem ainda por muitas vezes.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

ASSIS, MADELLON MELO DE. **Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias humanas**. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Os hepatócitos são células que exercem papel fundamental no metabolismo de diversos nutrientes e drogas. O estudo *in vitro* destes mecanismos é prejudicado pela perda da capacidade funcional observada em cultivos primários e nas linhagens tumorais de hepatócitos. Diante deste cenário, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas ferramentas para a obtenção de hepatócitos. Sabemos que as células-tronco embrionárias (CTEs) possuem a capacidade de originar todos os tipos celulares de um organismo. A modulação de diferentes vias de sinalização *in vitro* mimetiza os acontecimentos de cada etapa do desenvolvimento embrionário, que tem início nas CTEs e culminam em células especializadas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi gerar hepatócitos a partir de CTEs humanas visando a utilização desta ferramenta em estudos futuros de bioengenharia e testes de drogas. Para tal, utilizamos a linhagem embrionária humana HES2. A primeira etapa do protocolo foi a agregação das CTEs em corpos embrioides mediada principalmente por activina. A transição epitélio-mesenquimal ocorre a seguir sob a indução de activina, Wnt 3a e BMP4. Posteriormente, há a formação do endoderma sob ação da activina em cultivo tridimensional até o sétimo dia. Ao término desta etapa, a confirmação da geração do endoderma foi avaliada pelo aumento da expressão de CXCR4, CD117, EpCAM, FOX A2 e SOX17. A especificação hepática ocorreu em monocamada até o décimo quinto dia do protocolo, sob ação de FGF-10 e BMP4 e teve como resultado a geração de hepatoblastos. A última fase do protocolo, a maturação dos hepatócitos foi subdividida em duas etapas. A primeira foi mediada por HGF e Oncostatina M e, ao seu término, comprovou-se a expressão e secreção

de albumina por imunofenotipagem e ELISA, respectivamente. Já na última etapa, as células foram submetidas a cultivo em meio específico para hepatócitos maduros, o Hepatozyme®. As células obtidas ao final do protocolo mantiveram a morfologia poligonal, característica dos hepatócitos, com algumas células binucleadas. Concluímos que o protocolo de geração de hepatócitos a partir de CTEs foi concluído com alta eficiência tornando possível a implementação inédita desta ferramenta no IBCCF que poderá ser explorada em inúmeros estudos futuros.

Palavras chave: células-tronco embrionárias humanas, diferenciação, hepatócitos.

## ABSTRACT

ASSIS, MADELLON MELO DE. **Generation of hepatocytes from human embryonic stem cells.** Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Hepatocytes play fundamental role on the metabolism of several drugs and nutrients. In vivo studies are affected by the loss of functional capacity observed on primary cell cultures and tumoral hepatocytes lineages. The development of new innovative techniques for hepatocyte obtaining remains therefore urgent. It is well known that embryonic stem cells hold the capability to generate all the cell types of an organism. The cell signaling modulation mimics the embryonic development stages from the ESC to the fully committed cells. This study aims to generate hepatocytes from human ESC to be used in several further approaches as bioengineering and drug tests. For this purpose, embryonic HES2 human cells were used. The first step was the generation of embryoid bodies mediated by activin. After, occurs the transition epithelium-mesenchymal induced by activin, Wnt 3a and BMP4. Later, under activin effect in tridimensional culture, occurs the endoderm formation until the seventh day. The expression of CXCR4, CD117, EpCAM, FOX A2 and SOX17 was used to confirm the endoderm generation. Hepatic maturation was performed in monolayer, mediated by FGF-10 and BMP4 until the day 15 resulting the generation of hepatoblasts. Finally, the hepatocyte maturation was divided into two steps: the first was induced by HGF and oncostatin M. At the end of this step, albumin expression and secretion were confirmed by flow cytometry and ELISA, respectively. During the last step, cells were cultivated in a specific medium for mature hepatocytes (Hepatozyme®). At the end of this protocol, the culture displayed cells morphologically compatible to hepatocytes showing polygonal cells and some binucleated cells. Taken together, these data confirm the high efficiency in generating hepatocytes from ESC. This new and innovative approach possibly can be implemented in the IBCCF and applied in several further studies.

Keywords: human embryonic stem cells, differentiation, hepatocytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Marcos históricos do cultivo celular até o surgimento do protocolos de diferenciação.....	3
Figura 2: Diferenciação de células-tronco embrionárias em cultura.....	6
Figura 3: Geração de hepatócitos a partir de fibroblastos humanos. ....	8
Figura 4: Dados da linhagem HES2. ....	13
Figura 5: Desenho experimental da geração de hepatócitos a partir da HES2. ....	15
Figura 6: Desenho esquemático dos dias de realização das análises por citometria de fluxo.....	21
Figura 7: Esquema representativo da técnica PCR nested utilizada para avaliação da presença de micoplasmas nas células em cultivo.....	27
Figura 8: Microscopia de campo claro representativa de fibroblastos embrionários de camundongos.....	30
Figura 9: Avaliação da presença de micoplasmas por PCR. ....	30
Figura 10: Microscopia de campo claro do cultivo da linhagem HES2 cultivada sobre camada de MEF. ....	31
Figura 11: Perfil imunofenotípico da linhagem HES2 em relação aos marcadores de endoderma. ....	32
Figura 12: Microscopia de campo claro realizada no segundo dia de protocolo de diferenciação.....	33
Figura 13: Microscopia de campo claro do terceiro dia da diferenciação celular. ....	34
Figura 14: Dotplots representativos do terceiro dia de cultivo. ....	34
Figura 15: Fotomicrografia representativa do sétimo dia de cultivo. ....	35
Figura 16: Perfil imunofenotípico representativo dos marcadores de endoderma no sétimo dia de cultivo em relação. ....	35
Figura 17: Fotomicrografias representativas do oitavo dia de cultivo.....	36
Figura 18: Microscopia de campo claro do oitavo dia de cultivo. ....	37
Figura 19: Perfil imunofenotípico representativo dos marcadores do endoderma no décimo primeiro dia de cultivo. ....	38
Figura 20: Representação gráfica da análise estatística de EpCAM.....	39
Figura 21: Representação gráfica da análise estatística da expressão de CD117. ..	39
Figura 22: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma CXCR4. ....	40
Figura 23: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma FOXA2. ....	41
Figura 24: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma SOX17.....	41
Figura 25: Imagens representativas do décimo quarto dia de cultivo.....	42
Figura 26: Microscopia de campo claro representativa da fase de maturação hepática.....	43

Figura 27: Microscopia de campo claro da maturação hepática em cultivo tridimensional. ....	44
Figura 28: Histograma representativo da análise de expressão de albumina no vigésimo quarto dia do protocolo.....	44
Figura 29: Imagens representativas do quadragésimo terceiro dia de cultivo.....	45
Figura 30: Esquema representativo dos pontos de realização da citometria de fluxo. ....	45
Figura 31: Dotplots representativos de diferentes protocolos utilizados para a dissociação das células.....	46
Figura 32: Curva padrão de albumina. ....	47
Figura 33: Gráfico da análise estatística da produção de albumina. ....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Meio de cultivo basal para HES2.....	14
Tabela 2: Meio de agregação (D1).....	16
Tabela 3: Meio de indução do endoderma I (D2 ao D4).....	17
Tabela 4: Meio de indução do endoderma II (D4 ao D7).....	17
Tabela 5: Meio de especificação hepática I (D7 ao D9).....	18
Tabela 6: Meio de especificação hepática II (D9 ao D11).....	19
Tabela 7: Meio de geração de hepatoblastos (D11 ao D15).....	19
Tabela 8: Meio de maturação I (D15 ao D27).....	20
Tabela 9: Meio de maturação II (D27 ao D33).....	21
Tabela 10: <i>Primers</i> da avaliação da presença de micoplasmas.....	27
Tabela 11: Determinação da concentração de albumina nos controles utilizados no teste de ELISA. ....	47
Tabela 12: Determinação da concentração de albumina nos hepatócitos gerados (hep-HES2) pela técnica de ELISA. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF: fator de ativação transcricional (do inglês *Activating Transcription Factor*)

APC: alofococianina (do inglês *Allophycocyanin*)

BMP: proteína morfogenética óssea (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*)

BSA: albumina de soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CD: grupo de diferenciação (do inglês *Cluster of Differentiation*)

Cdx2: do inglês *Caudal Type Homeobox 2*

CTEs: células-tronco embrionárias

CXCR4: receptor de quimiocina tipo 4 (do inglês *C-X-C Chemokine Receptor Type 4*)

dNTP: deoxirribonucleotídeo trifosfato (do inglês *Triphosphate Deoxyribonucleotide*)

DMEM: meio eagle modificado por Dulbelcco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

EBs: corpos embrioides (do inglês *Embryoid Bodies*)

ESC: células-tronco embrionárias (do inglês *Embryonic Stem Rells*)

EDTA: ácido etilenodiamono tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

ELISA: ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

EpCAM: molécula de adesão da célula epitelial (do inglês *Epithelial Cell Adhesion Molecule*)

FGF: fator de crescimento de fibroblasto (do inglês *Fibroblast Growth Factor*)

FOXA: do inglês *Forkhead Box Protein A*

FSC: dispersão frontal (do inglês *Forward Scatter*)

FVS: ligante indicador de viabilidade (do inglês *Fixable Viability Stain*)

GATA-4: do inglês *GATA-binding Protein 4*

HCM: meio para cultivo de hepatócitos (do inglês *Hepatocyte Culture Medium*)

Hep-HES2: hepatócitos gerados a partir da linhagem HES2.

HES: células-tronco embrionárias humanas (do inglês *Human Embryonic Stem Cell*)

HGF: fator de crescimento hepático (do inglês *Hepatocyte Growth Factor*)

HNF: fator nuclear hepático (do inglês *Hepatocyte Nuclear Factor*)

IBCCF: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

iPS: célula-tronco pluripotente induzida (do inglês *induced pluripotent stem cell*)

KSR: soro Knockout substituto (do inglês *Knockout Serum Replacement*)

LCCM: Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular

MEF: fibroblastos de embriões de camundongos (do inglês *Mouse Embryonic Fibroblasts*)

MTG: monotioglicerol

Oct4: fator de transcrição de ligação ao octâmero - 4 (do inglês *Octamer-binding transcription factor 4*)

PBS: solução salina de tampão fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction*)

PE: ficoeritrina (do inglês *Phycoerythrin*)

PROX: do inglês *Prospero Homeobox Protein*

SA-HRP: estreptavidina conjugada à peroxidase (do inglês *Streptavidin-conjugated Horseradish Peroxidase*)

SFB: Soro Fetal Bovino

SSC: dispersão lateral (do inglês *Side Scatter*)

SSEA: antígeno embrionário estágio-específico (do inglês *Stage-specific Embryonic Antigen*)

SOX17: do inglês *Sex Determining Region Y - Box 17*

TRA: do inglês *Tumor Resistance Antigen*

TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA

TE: Tris-HCl e EDTA

TGF $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta (em inglês *Transforming Growth Factor Beta*)

TMB: 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

Wnt: do inglês *Wingless-type*

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. Cultivo de células .....	1
1.2. Células-tronco embrionárias .....	3
1.3. Diferenciação celular a partir de células-tronco embrionárias.....	5
1.4. Geração de hepatócitos por reprogramação de células somáticas.....	7
1.5. Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias .....	8
2. Justificativa .....	10
3. Objetivo.....	11
4. Materiais e Métodos.....	11
4.1. Obtenção de fibroblastos de embriões de camundongos .....	11
4.2. Cultivo, manutenção e criopreservação da linhagem embrionária HES2 .....	13
4.3. Diferenciação da linhagem HES2 em hepatócitos .....	15
4.4. Citometria de Fluxo .....	21
4.4.1. Marcação de proteínas localizadas na membrana celular .....	21
4.4.2. Marcação de proteínas intracelulares .....	23
4.4.3. Marcação de Albumina .....	24
4.5. Avaliação da produção de albumina por ELISA.....	25
4.6. Avaliação da presença de micoplasmas .....	26
4.7. Análises estatísticas.....	29
5. Resultados.....	29
5.1. Obtenção de MEF .....	29
5.2. Cultivo e expansão da linhagem HES2.....	31
5.3. Diferenciação da linhagem embrionária HES2 em hepatócitos .....	32
5.3.1. Agregação de EBs .....	32
5.3.2. Indução do endoderma .....	33
5.3.3. Especificação hepática .....	36
5.3.4. Maturação hepática.....	42
5.4. Padronização da técnica de citometria de fluxo .....	45
5.5. Avaliação da produção de albumina por ELISA .....	47
6. Discussão .....	49

7. Conclusão.....	53
8. Referências Bibliográficas .....	55
ANEXO I – Avaliação dos custos do projeto .....	62
ANEXO II – Avaliação de custos do uso de hepatócitos primários e linhagem de hepatocarcinoma.....	64

## 1. Introdução

### 1.1. Cultivo de células

O cultivo de células surgiu no início do século XX como uma tentativa de estudar o comportamento de células animais em ambiente controlado. O primeiro relato dessa técnica é de 1885 (Figura 1), quando Wilhelm Roux manteve vivas as células de embriões de galinha em solução salina por alguns dias (HAMBURGER, 1997).

Em 1907, Harrison investigava a dinâmica do desenvolvimento do sistema nervoso. Para isso, dissecou o tubo neural de um embrião de sapo, o submergiu em sua linfa, vedou o frasco e o observou diariamente. Harrison teve o cuidado de manter as condições assépticas e não necessitou de controle de temperatura porque o organismo em estudo era peilotérmico. As células sobreviveram por uma semana e seus resultados introduziram um novo modelo experimental (HARRISON, 1907).

Em 1912, Alexis Carrel desenvolveu um modelo de cultivo utilizando células cardíacas de embrião de galinha. Ele introduziu a ideia de que os nutrientes deveriam ser repostos para que a cultura sobrevivesse (CARREL, 1912). Anos mais tarde, ele desenvolvera os primeiros frascos de cultura.

Os primeiros estudos de cultivos celulares foram realizados com cultivos primários, obtidos diretamente de um tecido. Já as linhagens celulares estabelecidas surgiram quarenta anos mais tarde, concomitantemente aos primeiros meios de cultura quimicamente definidos. As linhagens estabelecidas são compostas de células que adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente. Além disso, apresentam menor variabilidade morfofuncional, aumentando a fidelidade e reprodutibilidade dos resultados. Elas podem ser obtidas de tecidos cancerosos ou por transformação. A transformação é uma alteração genética - causada por vírus, agentes químicos ou físicos - que altera o ciclo celular tornando a linhagem imortal (FRESHNEY, 2006).

Em 1951, a primeira linhagem de células humanas foi estabelecida a partir da coleta de tecido canceroso cervical da paciente Henrietta Lacks - as células HeLa. Essa linhagem serviu de modelo para estudos de câncer em laboratórios de todo o mundo e é ainda utilizada nos dias atuais (MASTERS, 2002). Até a década de 1960, acreditava-se que as culturas de células durariam infinitamente. Essa ideia foi

desconstruída pelos experimentos de Hayflick e Moorhead, onde foi demonstrado que as células apresentavam potencial limitado *in vitro* (HAYFLICK, 1965).

Em 1962, Nakamura e colaboradores estabeleceram a linhagem VERO, isolada de rim de macaco-verde-africano (*Cercopithecus aethiops*). Essa linhagem é utilizada ainda hoje na produção de imunobiológicos para uso humano (GOVORKOVA et al., 1996; BARRETT et al., 2011).

Em 1975 foi descrita a técnica de geração de hibridomas, que são linfócitos B fundidos à células isoladas de mieloma, capazes de secretarem anticorpos em grande quantidade. Esta técnica revolucionou a produção de imunobiológicos (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

Em 1981, Evans e Kaufman estabeleceram a primeira cultura de células-tronco embrionárias (CTEs) de embriões de camundongos. Esse trabalho representou um grande avanço científico porque foi possível a obtenção de células dos três folhetos embrionários *in vitro* (EVANS; KAUFMAN, 1981). Em 1995, Thomson e colaboradores isolaram a primeira linhagem de CTEs de primata (THOMSON et al., 1995). Anos mais tarde, em 1998, o mesmo grupo estabeleceu a primeira linhagem de CTEs humana (THOMSON et al., 1998). O isolamento das CTEs e o avanço das técnicas de cultivo, pontuados na linha do tempo da Figura 1, possibilitaram o desenvolvimento dos protocolos de diferenciação celular a partir de 2003.

O cultivo de células representou um grande avanço para a pesquisa biomédica por ser uma técnica que mimetiza um sistema biológico sob condições controladas. As células em cultivo possuem uma infinidade de aplicações que vão desde a pesquisa básica até a terapia celular. A descrição de fenômenos biológicos como a hibridação celular e o transporte por pinocitose utilizaram-se da técnica de cultivo celular (FELL, 1972). A virologia e a imunologia apropriaram-se do cultivo de células para o desenvolvimento de vacinas como a da poliomielite (ENDERS; WELLER; ROBBINS, 1949; DULBECCO; VOGT, 1954). Na farmacologia, a cultura celular ampliou os conhecimentos em torno dos mecanismos de toxicidade, interações celulares e alterações bioquímicas induzidas por substâncias químicas (FRESHNEY, 2001; SANTO et al., 2017). Já na bioengenharia e medicina regenerativa, o cultivo celular foi considerado um dos pilares de seu desenvolvimento. O transplante de pele artificial, a diferenciação celular e a

recelularização de órgãos são alguns dos exemplos dessa nova área em expansão (DUVAL et al., 2017; VIG et al., 2017).

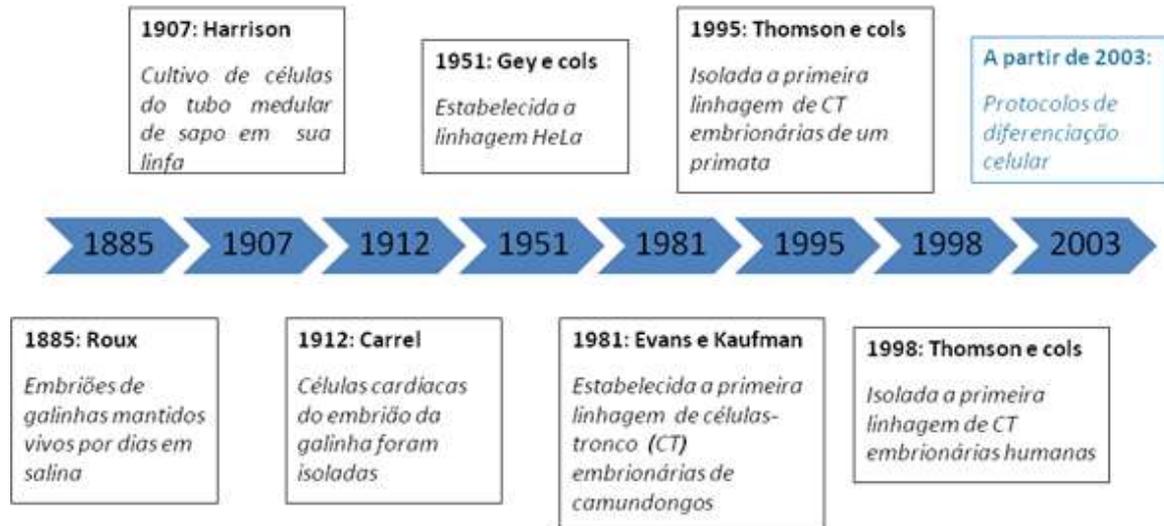


Figura 1: Marcos históricos do cultivo celular até o surgimento dos protocolos de diferenciação. A figura apresenta um breve histórico desde 1885 até 2003 do desenvolvimento do cultivo celular. Nos retângulos estão: os anos das descobertas, os pesquisadores responsáveis pela descrição do feito e a quebra de paradigma proporcionada por eles.

Além de todas as descobertas científicas utilizando células em cultivo, esta tecnologia minimiza questionamentos éticos em relação ao uso de animais. Em 2003, a União Europeia aprovou uma legislação inédita que representou um grande marco para a redução de uso de animais na pesquisa científica e desenvolvimento de cosméticos (PARLAMENTO EUROPEU, 2003). Dessa forma, a técnica de cultura de células é considerada um método alternativo ao uso de animais e sua utilização vem sendo encorajada não somente por cientistas, devido às variações fisiológicas entre as espécies, mas também por pressão da sociedade.

## 1.2. Células-tronco embrionárias

As CTEs são obtidas da massa celular interna do blastocisto. Na espécie humana e em camundongos, o blastocisto é um embrião pré-implantação entre 3 e 5 dias de desenvolvimento. Nesta etapa do desenvolvimento embrionário, as CTEs são capazes de gerar todos os tecidos do embrião (THOMSON et al., 1998).

Para as CTEs serem consideradas células-tronco pluripotentes, há que se obedecer aos seguintes critérios: possuírem cariótipo normal, capacidade de proliferação no estado indiferenciado *in vitro* e se diferenciarem nos três folhetos

embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). Devem também expressar marcadores característicos SSEA-3 (do inglês, *Stage-specific Embryonic Antigen*), SSEA-4, TRA-1-60 (do inglês, *Tumor Resistance Antigen*), TRA-1-81 e fosfatase alcalina. Em cultivo, organizam-se em colônias com bordas delimitadas, as células são arredondadas e possuem alta razão núcleo-citoplasma (THOMSON et al., 1998; COWAN et al., 2004).

As células-tronco embrionárias apresentam também uma refinada maquinaria de reparo aos danos genéticos. Os mecanismos atuam prevenindo o acúmulo de alterações e o reparo do DNA ou inibindo que variantes genéticas sejam transmitidas às gerações futuras (MANDAL et al, 2011). Se estas ações não forem suficientes, há ainda o recurso de paralisação do ciclo celular com inativação permanente das células que não puderam ser reparadas (VITALE et al., 2017).

No Brasil, a Lei de Biossegurança de número 11.105 do ano de 2005, prevê, em seu art. 5º, a autorização para o uso dos embriões excedentes das técnicas de fertilização *in vitro* para extração de células-tronco. Para atender à legislação, os embriões devem ser considerados inviáveis tecnicamente, estarem congelados há pelo menos três anos e os genitores devem consentir a doação para a pesquisa por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. No Brasil, as primeiras linhagens de CTEs foram geradas pelo grupo da professora Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo (FRAGA et al., 2011).

A alta plasticidade das células-tronco pluripotentes pode ser explorada como vantagem ou como limitação para a pesquisa científica. Isso porque sua capacidade em gerar inúmeros tipos celulares está intimamente associada à formação de teratomas quando implantadas em um organismo adulto, já que os mecanismos de diferenciação celular não são completamente elucidados e controlados. Em contrapartida, esta pluripotencialidade pode ser utilizada para nos auxiliar justamente a entender tais processos *in vitro*, tornando os estudos de diferenciação celular a partir de CTEs uma nova e promissora área de investigação (PEREIRA, 2008).

A importância da utilização das células-tronco pluripotentes fica ainda mais evidenciada quando trabalhos relacionados ao desenvolvimento de modelos biológicos de doenças, terapias celulares e plataformas de testes de drogas demonstraram a relevância das CTEs como ferramentas que permitiram o desenvolvimento de tais estudos. A transposição desse potencial das CTEs para a

prática científica e industrial está intrinsecamente relacionada ao grau de conhecimento sobre as vias de sinalização que ocorrem durante a diferenciação celular e a geração dos tecidos e órgãos (HOLDITCH; TERZIC; IKEDA, 2014; DUNCAN; VALENZUELA, 2017; TANG et al., 2017).

### **1.3. Diferenciação celular a partir de células-tronco embrionárias**

O processo de diferenciação celular a partir de CTEs foi descrito primeiramente em cardiomiócitos. A diferenciação em cardiomiócitos a partir destas células inicialmente apresentava grande variabilidade nos resultados devido à utilização do soro fetal bovino (SFB) nas condições de cultivo (XU et al., 2002).

Visando melhorar a eficácia dos resultados, surgiram técnicas de cocultivo numa tentativa de mimetizar as sinalizações que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. Progressivamente com o aumento do conhecimento sobre os processos de sinalização celular, o uso de SFB foi sendo substituído pelo uso de meios quimicamente definidos. Isso também contribuiu para maior reprodutibilidade dos processos, dada a variabilidade entre os lotes deste reagente e a inespecificidade no direcionamento das diferenciações (TAKAHASHI et al., 2003; KUBO et al., 2004; PASSIER et al., 2005).

O conhecimento dos processos de sinalização que promovem o comprometimento celular com os tecidos a que darão origem permitiu o aprimoramento dos processos que levam à geração de células neurais, pancreáticas, hematopoiéticas e cardíacas, dentre outras, conforme exemplificado na Figura 2 (MURRY; KELLER, 2008).

Nos cultivos de CTEs, a introdução de ácido retinóico, BMP4 (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*), activina A, Wnt (do inglês *Wingless-type*), e FGF (do inglês *Fibroblast Growth Factor*), dentre outras moléculas, mostrou-se essencial para o direcionamento do tipo celular almejado. O tratamento, por exemplo, com ácido retinóico das CTEs em cocultivo com linhagens estromais resultou no desenvolvimento de células de origem ectodérmica, como os neurônios (KAWASAKI et al., 2000).

Já o cultivo das CTEs sob indução de BMP4 originaram uma população *Brachyury* positiva, encontrada na linha primitiva e no mesoderma. Além disso, a estimulação com BMP4 e activina A levou ao desenvolvimento do mesoderma cardíaco (PARK et al., 2004). Kubo e colaboradores demonstraram que a ativação

da via Nodal pela activina A e Wnt resultou tanto na formação da linha primitiva, quanto na geração subsequente do mesoderma ou endoderma, a depender da intensidade da indução (KUBO et al., 2004). Outros pesquisadores observaram que o bloqueio da via de Wnt no momento correto reduziu o desenvolvimento hematopoiético (WOLL et al., 2008). Assim, esses resultados demonstram que, apesar de derivarem do mesmo folheto embrionário, os processos de indução para a geração dessas células são diferentes mesmo nas fases iniciais do desenvolvimento (LAFLAMME et al., 2007).

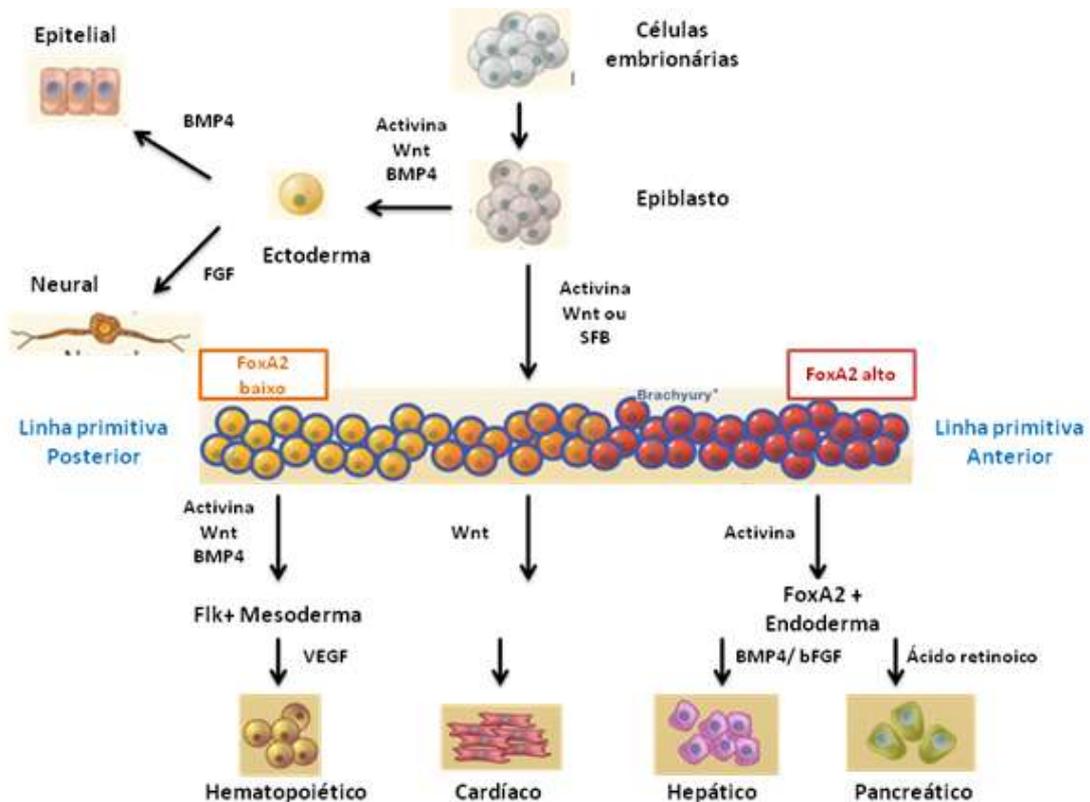


Figura 2: Diferenciação de células-tronco embrionárias em cultura. Na figura estão descritas algumas das principais citocinas e fatores tróficos envolvidos na diferenciação celular em diversos tecidos oriundos dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). Adaptado de MURRY; KELLER, 2008.

O número e o impacto na saúde pública de doenças relacionadas a órgãos derivados do endoderma, como pâncreas e fígado, estimula a busca pela geração desse folheto embrionário (MURRY; KELLER, 2008; ZHOU et al., 2012; CARPENTIER et al., 2016). Dados esses que também motivaram que o foco desta dissertação fosse a geração de hepatócitos em cultivo.

#### 1.4. Geração de hepatócitos por reprogramação de células somáticas

Devido à dificuldade da manutenção de hepatócitos *in vitro*, diversos grupos de pesquisa investigaram se a ativação direta de fatores de transcrição específicos seria capaz de induzir células somáticas a diferenciarem diretamente em hepatócitos. O conhecimento dos genes envolvidos na especificação hepática foi a base para a indução da diferenciação celular direta mediada por transfecção. A super expressão de FoxA (do inglês *Forkhead Box A Protein*) ou sua combinação com GATA-4 (do inglês *GATA-binding Protein 4*) foi essencial para tal objetivo (HUANG et al., 2011; SEKIYA et al., 2011).

Posteriormente, e de forma semelhante, outros dois grupos demonstraram a viabilidade desta estratégia ao induzirem a reprogramação direta de fibroblastos em células hepáticas. Yu e colaboradores, em 2013, demonstraram que HNF1 $\beta$  (do inglês *Hepatocyte Nuclear Factor*) e FoxA3 foram eficazes na reprogramação de fibroblastos. As células geradas por este protocolo apresentaram potencial de diferenciação em hepatócitos e colangiócitos (YU et al., 2013).

Du e colaboradores reprogramaram fibroblastos humanos em hepatócitos utilizando os fatores HNF1a , HNF4a, HNF6 junto com os fatores de maturação ATF5 (do inglês *Activating Transcription Factor*), PROX1 (do inglês *Prospero Homeobox Protein*) e CEBPA. Os hepatócitos obtidos apresentaram capacidade metabólica de largo espectro compatível com hepatócitos primários (DU et al., 2014).

Recentemente, foi demonstrada a diferenciação de hepatócitos pela superexpressão de Oct4 (do inglês *Octamer-binding Transcription Factor 4*), GATA-3, HNF1 e FOXA2 em fibroblastos (WU; JIN; GAO, 2017).

Muitas críticas têm sido feitas à reprogramação direta em relação a maturidade dos hepatócitos gerados (SEKIYA et al., 2011; GÉRARD; TYS; LEMAIGRE, 2016). Além disso, o conhecimento acumulado referente aos fatores de transcrição em estudos realizados com camundongos nem sempre pode ser aplicado nas diferenciações com células humanas, conforme demonstrado por Odom e colaboradores (ODOM et al., 2007).

Estudos genéticos em hepatócitos gerados por diferenciação direta comprovaram a presença de Cdx2 (do inglês *Caudal Type Homeobox 2*), um regulador do processo de diferenciação em células intestinais cujo papel no comprometimento hepático ainda não foi elucidado. Além disso, a inserção de genes

ocorre de maneira aleatória, o que reduz a eficiência do processo e dificulta a previsão dos resultados obtidos em casa diferenciação (HUANG et al., 2011; KIM et al., 2015).

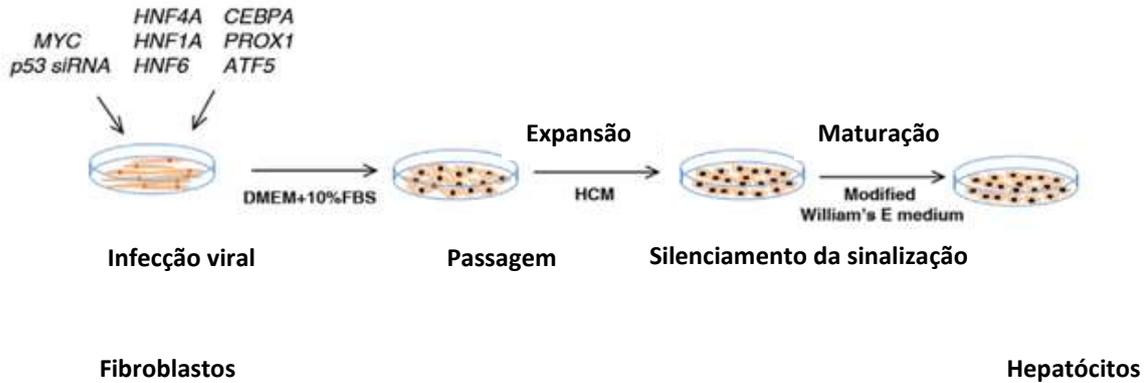


Figura 3: Geração de hepatócitos a partir de fibroblastos humanos. Os fibroblastos são submetidos à infecção viral de fatores relacionados à diferenciação hepática: HNFs (fatores nucleares hepáticos), CEBPA, PROX e ATF (fator de ativação transcricional) e plaqueados em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e expandidos em HCM (meio específico para hepatócitos). Posteriormente, há o silenciamento da sinalização p53 e a maturação ocorre em meio William's. Adaptado de DU et al., 2014.

Outra limitação importante é que os estudos de diferenciação direta utilizam vetores virais para superexpressar genes, o que tem consequências ainda desconhecidas nas células geradas e, conseqüentemente, no seu uso em transplantes futuros (MA et al., 2014).

### 1.5. Geração de hepatócitos a partir de células-tronco embrionárias

A geração de hepatócitos a partir de CTEs mimetiza as condições da embriogênese, por este motivo o protocolo inicia-se na indução do endoderma, passando pela especificação hepática e, por fim, a maturação hepática.

A íntima relação entre o endoderma e o mesoderma em cultivo sugere a existência de um progenitor comum para os dois folhetos. Por isso, muitas vias de sinalização descritas na geração de cardiomiócitos, onde os estudos começaram, guiaram a indução do endoderma (KUBO et al., 2004).

A fase de indução do endoderma é mediada principalmente pela adição de activina A, BMP4 e Wnt. Durante a gastrulação, a sinalização mediada pela proteína Nodal estabelece a diferenciação entre endoderma e mesoderma. Esta molécula ativa os fatores de transcrição FOXA2 e SOX17 (do inglês Sex determining Region Y

- Box 17), indispensáveis à formação do endoderma. O papel do FOXA2 já é bem descrito. Ele está envolvido no descondensamento da cromatina de genes responsáveis pelo desenvolvimento hepático (KIM et al., 2010). A importância de SOX17 na indução do endoderma é bem conservada ao longo do processo evolutivo e foi descrita em *Xenopus* e peixe-zebra em 1998 (HENRY; MELTON, 1998).

Além da via Nodal, o mesoderma adjacente é responsável por induzir a diferenciação hepática através da produção de FGF, BMP e Wnt. Nesse estágio, também surgem os progenitores hematopoiéticos (ROSSI et al., 2001).

Nodal e BMP pertencem à superfamília de TGF $\beta$  (do inglês *Transforming Growth Factor Beta*) e agem através de sua ligação com dois tipos de receptores (Smad 1 e 2). Quando ativado, o complexo receptor fosforila as proteínas Smad. (GUO; WANG, 2009). A Nodal/Activina age através da ativação das Smad 2 e 3 (MASSAGUE; WOTTON, 2000). A via é reconhecida como Activina/Nodal porque as moléculas se ligam aos mesmos receptores e desencadeiam sinalizações similares (KUMAR et al., 2001).

A atividade do BMP é regulada pelo complexo Smad 1, 5 e 8 que formam um complexo com Smad 4. Este recruta a histona acetiltransferase P300 que estimula a expressão de GATA4 e genes hepáticos (XU et al., 2011).

A via de sinalização mediada por FGF está relacionada à expressão HNF4 (ROSSI et al., 2001). HNF-4 é um fator de transcrição que desempenha um importante papel na expressão de diversos genes envolvidos na organogênese do fígado (SLADEK et al., 1999).

O Wnt age juntamente com o FGF na região posterior do que dará origem ao tubo intestinal (MCLIN et al., 2007). Posteriormente, a inativação da mesma via, leva à especificação da região posterior que passa a expressar HNF1B e HNF4 (TOUBOL et al., 2016).

Os fatores de transcrição FOXA1 e FOXA2 possuem funções tempo-específicas. Eles possuem uma função na indução do endoderma e uma outra função na maturação hepática (BOCHKIS et al., 2012), o que explicita o refinamento do desenvolvimento embrionário e a importância das interações célula-célula e célula-matriz.

A fim de comprovar a formação do endoderma, apesar de ainda não existir um marcador específico, avalia-se principalmente a expressão das seguintes moléculas: CXCR4 (do inglês *Chemokine Receptor Type 4*), CD117, EpCAM (do

inglês *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), FOXA2 e SOX17 (GREEN et al., 2011; LOH et al., 2014; WANG et al., 2015; HOLTZINGER et al., 2015; KANG et al., 2017).

Uma vez gerado o endoderma, a especificação hepática ocorre sob influência do FGF-10 e BMP4 (TOUBOUL et al., 2010). Suzuki e colaboradores demonstraram que o HGF (do inglês *Hepatocyte Growth Factor*) participa da maturação hepática, influenciando diretamente no número de células secretoras de albumina *in vitro*. Este grupo também demonstrou o papel da oncostatina M no processo de maturação (SUZUKI et al., 2003). *In vivo*, a oncostatina M é produzida pelas células hematopoiéticas adjacentes (KAMIYA et al., 1999).

Além das sinalizações químicas, o cultivo tridimensional tem mostrado bons resultados na etapa de maturação, conforme demonstrado por diferentes grupos (MIKI; RING; GERLACH, 2011; OGAWA et al., 2013).

Assim, há um grande número de protocolos descrevendo a geração de hepatócitos em cultivo, o que reflete não só a variedade de aplicações dessas células, mas também a busca incessante da comunidade científica em conseguir um protocolo robusto de diferenciação hepática (CARPENTIER et al., 2016; WILLEMSE et al., 2017).

## **2. Justificativa**

O fígado desempenha papel central na regulação dos processos fisiológicos do organismo. Possui funções endócrinas, exócrinas, armazena glicogênio, coordena a síntese e o transporte de colesterol, realiza o processo de detoxificação de drogas e secreta diversas proteínas plasmáticas (SI-TAYEB; LEMAIGRE; DUNCAN, 2010). Devido à importância das funções realizadas pelo órgão, há um grande esforço científico para compreender os processos do desenvolvimento embrionário, bem como para reproduzir as funções dos hepatócitos maduros *in vitro*.

Além disso, o estabelecimento do cultivo primário de hepatócitos não fornece resultados satisfatórios. O potencial proliferativo é reduzido e ainda não foi descrita uma técnica de expansão eficiente destas células em condições artificiais. *In vitro*, os hepatócitos mantêm a morfologia, mas perdem a capacidade funcional. Outra problemática, além da escassez de doadores, é a variabilidade dos resultados entre as amostras advindas de diferentes doadores. Alguns bancos especializados comercializam hepatócitos humanos obtidos a partir de cultivo primário para a realização de pesquisas científicas e testes de toxicidade. Entretanto, a

interpretação dos resultados é prejudicada pela falta de padronização das características morfofuncionais (GUO et al., 2011; FUKUDA et al., 2017).

O uso de linhagens hepáticas apresenta como vantagem a facilidade de manutenção em cultivo e a alta capacidade proliferativa. No entanto, estas linhagens são, em sua maioria, tumorais e possuem baixa expressão na produção de enzimas envolvidas no processo de detoxificação como as do complexo P450 (CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, e CYP3A4), o que restringe seu uso para testes de fármacos. (WESTERINK; SCHOONEN, 2007).

Diante das limitações envolvendo o cultivo de hepatócitos, o desenvolvimento da técnica de diferenciação celular representa uma grande possibilidade para melhor compreensão da fisiologia do órgão, avaliação de drogas e terapias celulares relacionadas.

### **3. Objetivo**

Estabelecer a técnica de geração de hepatócitos *in vitro* a partir de células-tronco embrionárias humanas.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Obtenção de fibroblastos de embriões de camundongos**

O protocolo descrito a seguir foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob número 031/14.

Os camundongos da linhagem C57/Bl6 foram mantidos em mini-isoladores acoplados a uma estante com sistema de ventilação, com temperatura controlada ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de claro/escuro de 12 em 12 horas. Eles foram alimentados com água e ração *ad libitum* no Biotério Multiusuário de Pequenos Roedores, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), UFRJ.

Passados quatorze dias da confirmação do acasalamento, as fêmeas grávidas foram eutanasiadas por asfixia por  $\text{CO}_2$  seguida de deslocamento cervical. A cavidade abdominal foi aberta e seu útero contendo vários sacos gestacionais, removido. Os embriões foram isolados e suas vísceras e cabeças foram removidas. O material restante dos embriões foi fracionado com tesoura e incubado com Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A tripsina foi inativada pela

adição de meio contendo 5 mL de DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 100 U/mL de Penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco). Este meio foi denominado meio MEF e foi utilizado nos fibroblastos de embriões de camundongos (MEF, do inglês *Mouse Embryonic Fibroblasts*). A suspensão foi centrifugada a 300 × g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi ressuspensionado em meio MEF e distribuído em placas de 100 mm<sup>2</sup>, na proporção de um embrião por placa.

Após a confluência, as células foram dissociadas com tripsina-EDTA 0,25% e expandidas por duas passagens. O fator de expansão utilizado nas duas passagens foi de 10 vezes. Na terceira passagem, as células foram dissociadas e seu conteúdo coletado em meio MEF em um tubo de fundo cônico de 50 mL. Esse tubo foi submetido a 30 Gy de radiação-γ no Irradiador Gammacell 220 (Nordion) com fonte de cobalto-60 no Laboratório de Instrumentação Nuclear, localizado no Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), UFRJ. O objetivo deste procedimento foi paralisar o ciclo celular dos fibroblastos. Após a irradiação, as células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan 0,4% (Sigma) em PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*). A suspensão celular foi então centrifugada a 300 × g por 5 minutos.

Para o congelamento, as células foram ressuspensionadas em solução de 10% de DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma) em soro fetal bovino. A concentração de  $2 \times 10^6$  células foram criopreservadas em cada criotubo. Os criotubos foram colocados em recipiente propício para o congelamento lento, que proporciona o resfriamento celular na taxa de 1°C por minuto (Mr Frosty® - ThermoFisher), e este acondicionado no freezer a 80°C negativos.

Para que as células passassem pelo teste de detecção de micoplasma, foi descongelado um criotubo. Estas células foram colocadas em cultivo para a coleta do sobrenadante no dia seguinte. Após o resultado negativo, os criotubos foram transferidos para um tanque criogênico e ficaram submersos em nitrogênio líquido até o uso.

Uma semana após o congelamento foi realizado o teste de diluição da MEF, onde são feitas diluições crescentes para avaliar a confluência ideal para plaqueamento. Como a MEF foi irradiada e teve seu ciclo celular interrompido, elas são descongeladas já na confluência adequada para o cultivo, correspondente a 70-

80% de confluência (cerca de 0,5 milhão de células por placa de cultivo de 100 mm<sup>2</sup>).

As células irradiadas foram descongeladas em placas recobertas com gelatina Porcina (Sigma) 0,2% em PBS e mantidas em meio MEF de 24 a 48 horas antes do plaqueamento das células-tronco embrionárias.

#### 4.2. Cultivo, manutenção e criopreservação da linhagem embrionária HES2

A linhagem celular embrionária HES2 (do inglês *Human Embryonic Stem Cell*) foi importada do banco de células WiCell (Figura 4).

Product Information	
Product Name	ES02
Lot Number	ES02-DL-03
Parent Material	ES02-MCB-01
Depositor	ES Cell International
Banked by	WiCell
Thaw Recommendation	Thaw 1 vial into 1 well of a 6 well plate.
Culture Platform	Feeder Dependent Medium: hES Medium Matrix: MEF
Protocol	WiCell Feeder Dependent Protocol
Passage Number	p66  These cells were cultured for 65 passages prior to freeze. WiCell adds +1 to the passage number at freeze so that the number on the vial best represents the overall passage number of the cells at thaw.
Date Vialled	29-August-2008
Vial Label	ES02-DL-3 p66 LK 29 AUG 2008 SCPC0350
Biosafety and Use Information	Appropriate biosafety precautions should be followed when working with these cells. The end user is responsible for ensuring that the cells are handled and stored in an appropriate manner. WiCell is not responsible for damages or injuries that may result from the use of these cells. Cells distributed by WiCell are intended for research purposes only and are not intended for use in humans.

Testing Performed by WiCell				
Test Description	Test Provider	Test Method	Test Specification	Result
Post-Thaw Viable Cell Recovery	WiCell	SOP-CH-305	≥ 15 Undifferentiated Colonies, ≤ 30% Differentiation	Pass
Identify by STR	LW Molecular Diagnostics Laboratory	PowerPlex 1.2 System by Promega	Match	Pass
Sterility - Direct transfer method	Apptec	30744	No contamination detected	Pass
Mycoplasma	Apptec	30055	No contamination detected	Pass
Karyotype by G-banding	WiCell	SOP-CH-003	Normal karyotype	Pass
Flow Cytometry for ESC Marker Expression	LW Flow Cytometry Laboratory	SOP-CH-101 SOP-CH-102 SOP-CH-103 SOP-CH-105	Report - no specification	See report

Amendments		Reason for Amendment	Date
CoA updated to include CoA information.			See signature
CoA updated for format changes, including adding fields of thaw recommendation, vial label, protocol, and banked by, and removal of footnotes.			29-JUN-13
CoA updated for format changes, clarification of test specifications, test method, addition of test provider, culture platform, and electronic signature, and reference to WiCell instead of the NSCB.			25-AUG-10
Original CoA			20-FEB-08

Figura 4: Dados da linhagem HES2. Ficha de informação do produto e resultados dos testes realizados na linhagem antes do envio.

Ao chegarem, as células foram descongeladas em 2 mL de meio MEF e a suspensão foi centrifugada a 300 x g por 5 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em meio basal cuja composição está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1: Meio de cultivo basal para HES2**

Reagente	[ ] final	Fabricante
DMEM/ F12	Meio base	Gibco
KnockOut™ Serum Replacement (KSR)	20%	Gibco
L-glutamina	2 mM	Gibco
Aminoácidos não-essenciais	0,7 mM	Gibco
β-mercaptoetanol	55 μM	Gibco
Piruvato de sódio	2 mM	Gibco
β-FGF	10 ng/mL	Tocris
Penicilina/ Estreptomicina	100 U/mL/ 100 μg/mL	Gibco

As células HES2 foram plaqueadas sobre uma camada de células MEF já aderidas em placa de cultivo celular de 100 mm<sup>2</sup>. A troca do meio foi realizada diariamente observando sempre a manutenção da confluência da camada alimentadora de células, MEF, entre 70 a 80% de confluência. Quando necessário era acrescentado mais MEF durante o cultivo.

As células HES2 organizam-se em colônias, por esse motivo, deve-se estar atento à sua morfologia para garantir o estágio indiferenciado para o protocolo pretendido e também para a criopreservação.

Para a passagem das células, quando estas ocupavam cerca de 80 a 90% da placa de 100 mm<sup>2</sup>, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se 2 mL de Tripsina-EDTA 0,25%. Ao observar as células se desprendendo da placa, a suspensão celular foi coletada com a pipeta e transferida para um tubo contendo 4 mL de meio MEF. O tubo foi centrifugado a 300 x g por 5 minutos. Para o replaqueamento, as células foram contadas e o número de células necessário para o experimento foi

novamente transferido para cultivo sobre nova camada de MEF previamente aderidas.

Para o congelamento, com o objetivo de obter um estoque da linhagem, as células foram ressuspensas cuidadosamente em meio contendo 90% de SFB e 10% de DMSO e distribuídas em criotubos. Cada criotubo possui 1 mL da suspensão celular na concentração  $10^6$  células/mL. Repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para o congelamento de MEF.

#### 4.3. Diferenciação da linhagem HES2 em hepatócitos

A diferenciação de células pluripotentes humanas em hepatócitos foi baseada nos estudos de Ogawa e colaboradores, publicado em 2013 (OGAWA et al., 2013). Na Figura 5 encontram-se compiladas as principais etapas de execução deste protocolo.

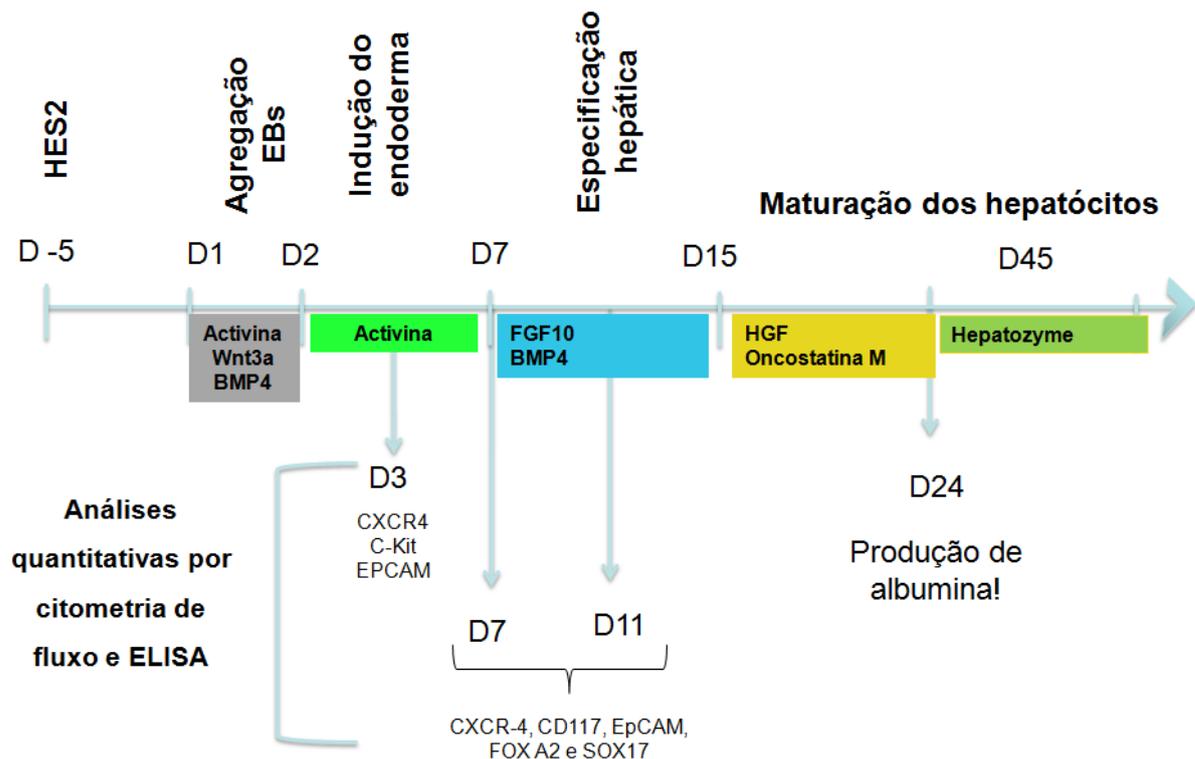


Figura 5: Desenho experimental da geração de hepatócitos a partir da HES2. Na figura estão destacadas as principais citocinas envolvidas em cada e as análises a serem realizadas. No primeiro dia, ocorreu a agregação dos corpos embrioides (EBs) seguida da indução do endoderma sob influência da activina, BMP4 e Wnt3a. A especificação hepática ocorreu a partir do sétimo dia e teve como principais moduladores o FGF-10 e o BMP4. A maturação dos hepatócitos, a partir do décimo quinta dia, teve como principais indutores as citocinas HGF e Oncostatina M. No terceiro, sétimo, décimo primeiro e vigésimo quarto dias foram realizadas análises para avaliar se as células apresentavam moléculas correspondentes a fase de desenvolvimento que estavam.

Para o início do protocolo era necessário que as placas de 100 mm<sup>2</sup> estivessem com cerca de 90% de confluência. O procedimento de tripsinização ocorreu como descrito previamente com Tripsina-EDTA 0,25%.

As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan 0,4% em PBS e colocadas em uma placa de Petri (100 mm<sup>2</sup>) *low cluster* (Corning) na concentração de 1 milhão de células/mL no meio de agregação descrito na Tabela 2. Este tipo de placa possui tratamento específico para dificultar a adesão celular, sendo ideal para o cultivo tridimensional. A placa foi, então, submetida à agitação suave (10 oscilações por minuto no Agitador tipo gangora MR-1, Biosan) por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C com o objetivo de formar pequenos aglomerados celulares chamados de corpos embrioides (EBs).

**Tabela 2: Meio de agregação (D1)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
StemPro-34®	Meio base	Gibco
L-glutamina	2 mM	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
Monotioglicerol (MTG)	4,5 x 10 <sup>-4</sup> M	Sigma
β-FGF	2,5 ng/mL	Tocris
Activina A	100 ng/mL	R&D Systems
Wnt3a	25 ng/mL	R&D Systems
BMP-4	3 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL/ 100 µg/mL	Gibco

No segundo dia do protocolo (D2), a suspensão celular contida na placa foi transferida para um tubo de fundo redondo (BD Biosciences), onde se aguardou a decantação dos EBs. Feito isso, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e os EBs plaqueados, no meio de indução do endoderma descrito na Tabela 3, em placa *low cluster* de 6 poços (Corning).

No terceiro dia de cultivo (D3), uma amostra das células foi submetida à imunofenotipagem por citometria de fluxo para busca de um perfil de expressão relacionado à indução do endoderma. Para isso, foi avaliada a expressão das seguintes moléculas de superfície: CXCR-4 (APC *mouse anti human* CD184/CXCR4 - BD Biosciences, catálogo 555976), CD117 (PE *mouse anti human* CD117/ c-KIT –

BD Biosciences, catálogo 555714), EpCAM (PE anti EpCAM – BD Biosciences, catálogo 347198).

**Tabela 3: Meio de indução do endoderma I (D2 ao D4)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
StemPro-34®	Meio base	Gibco
L-glutamina	2 mM	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
β-FGF	2,5 ng/mL	Tocris Bioscience
Activina A	100 ng/mL	Sigma
Wnt3a	25 ng/mL	R&D Systems
BMP-4	0,25 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL/ 100 µg/mL	Gibco

No quarto dia (D4), a ativação da via de Wnt foi reduzida, diminuindo a concentração de Wnt3a. Novamente, os EBs foram decantados para a troca do meio descrito na Tabela 4.

**Tabela 4: Meio de indução do endoderma II (D4 ao D7)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
StemPro-34®	Meio base	Gibco
L-glutamina	2 mM	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
β-FGF	5 ng/mL	Tocris Bioscience
Activina A	100 ng/mL	R&D Systems
Wnt3a	25 ng/mL	R&D Systems
BMP-4	0,25 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL /100 µg/mL	Gibco

No sétimo dia (D7), uma amostra do experimento foi submetida à imunofenotipagem para avaliação da expressão das moléculas: CXCR4, CD117, EpCAM e FOXA2 (PE *mouse anti-human FoxA2*, BD Biosciences, catálogo 561589) e SOX17 (PE *mouse anti-human Sox17*, BD Biosciences, catálogo 561591). O percentual de células positivas neste momento deveria ser superior àquele encontrado em D3, mostrando o comprometimento com a indução de endoderma. Nos casos onde este perfil não foi observado, as células foram descartadas.

Para a próxima etapa da diferenciação, os EBs foram transferidos para tubos de 15 mL e dissociados colocando-se 1 mL de Colagenase I (Collagenase, Tipo I – Gibco, 1 mg/mL – diluída em PBS com 0,9 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  e 0,49 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ ) e incubando a 37°C por 15 minutos. A Colagenase I foi removida e, em seguida, adicionado 1 mL de Tripsina-EDTA 0,25% e incubado em temperatura ambiente por cerca 30 segundos. Após esse período, a enzima foi inativada com 2 mL de meio DMEM, 50% de SFB e 2 U/ $\mu\text{L}$  de DNase I (Invitrogen). Esta suspensão foi submetida a centrifugação a 300 x g por 5 minutos.

As células foram quantificadas e plaqueadas na concentração de  $10^5$  células/mL em placa de 12 poços (Corning). A placa foi previamente tratada com Matrigel® *Growth Factor Reduced* a 1% (Corning) diluído em PBS (1:100) durante 1 hora antes do plaqueamento das células em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Após este período, o excesso de matrigel foi descartado e as células ressuspensas no meio de especificação hepática I descrito na Tabela 5.

**Tabela 5: Meio de especificação hepática I (D7 ao D9)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
StemPro®-34	Meio base	Gibco
L-glutamina	2 mM	Gibco
Ácido ascórbico	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Tocris Bioscience
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
$\beta$ -FGF	5 ng/mL	Tocris Bioscience
Activina A	50 ng/mL	R&D Systems
BMP-4	0,25 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL /100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Gibco

No nono dia de protocolo as células foram submetidas ao segundo meio de especificação hepática com diferente composição (Tabela 6).

**Tabela 6: Meio de especificação hepática II (D9 ao D11)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
Iscove's (IMDM)	Meio base	Gibco
Vitamina B-27	1%	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
FGF-10	50 ng/mL	R&D Systems
BMP-4	50 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL /100 µg/mL	Gibco

A próxima etapa do protocolo foi a geração de hepatoblastos. Nesta etapa o meio de cultura, descrito na Tabela 7 foi trocado a cada dois dias. As células nesta etapa já não possuem grande potencial proliferativo. Porém, quando observava-se confluência de 90%, realizava-se a passagem na proporção 1:2. Para a dissociação da monocamada foi utilizada Colagenase I e Tripsina-EDTA 0,25% conforme descrito anteriormente.

**Tabela 7: Meio de geração de hepatoblastos (D11 ao D15)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
Iscove's (IMDM)	Meio base	Gibco
Vitamina B-27	1%	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
β-FGF	20 ng/mL	Tocris Bioscience
BMP-4	50 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL /100 µg/mL	Gibco

No décimo primeiro dia (D11), uma amostra da cultura foi submetida à citometria de fluxo novamente para avaliação das mesmas moléculas já avaliadas no sétimo dia. O objetivo dessa etapa é verificar se essas moléculas permanecem sendo expressas ou sua expressão é reduzida.

As fases subsequentes são de maturação dos hepatoblastos. Na primeira delas, a cultura ocorre em monocama aderente no meio de maturação I descrito na Tabela 8 que foi trocado a cada dois dias.

No vigésimo quarto (D24) foi realizada nova avaliação por citometria de fluxo, desta vez para verificar a expressão de albumina. Para a dissociação das células, foi usada a Colagenase do tipo I e Tripsina-EDTA 0,25% conforme já detalhado.

Após a comprovação da expressão de albumina, retirou-se uma amostra do sobrenadante do cultivo para avaliação da secreção de albumina por ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

**Tabela 8: Meio de maturação I (D15 ao D27)**

Reagente	[ ] final	Fabricante
Iscove's (IMDM)	Meio base	Gibco
Vitamina B-27	1%	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
L-glutamina	2 mM	Gibco
MTG	$4,5 \times 10^{-4}$ M	Sigma
HGF	20 ng/mL	R&D Systems
Dexametasona	40 ng/mL	Sigma
Oncostatina M	20 ng/mL	R&D Systems
Penicilina/ Estreptomicina	100 U/mL /100 µg/mL	Gibco

Na etapa seguinte do protocolo, as células foram novamente colocadas em suspensão conforme o protocolo originalmente descrito por Ogawa e colaboradores (OGAWA et al, 2013). Para tal,  $6 \times 10^5$  células/mL foram colocadas em placas de 100 mm<sup>2</sup> do tipo *low cluster* no meio de maturação II descrito na Tabela 9.

Entre os dias 33 e 45, os agregados foram dissociados com solução de Colagenase I/ Tripsina-EDTA 0,25% e colocados, sobre placa tratada previamente com matrigel, em meio Hepatozyme® (Gibco) para avaliar sua sobrevivência em meio específico para cultivo de hepatócitos maduros. Os hepatócitos obtidos ao término da diferenciação foram denominados hep-HES2.

Tabela 9: Meio de maturação II (D27 ao D33)

Reagente	[ ] final	Fabricante
Iscove's (IMDM)	Meio base	Gibco
Vitamina B-27	1%	Gibco
Ácido ascórbico	50 µg/mL	Tocris Bioscience
L-glutamina	2 mM	Gibco
MTG	4,5 x 10 <sup>-4</sup> M	Sigma
HGF	20 ng/mL	R&D Systems
Dexametasona	40 ng/mL	Sigma
Oncostatina M	20 ng/ mL	R&D Systems
Rho- kinase inibitor	10 µM	Tocris Bioscience
Albumina de soro bovino (BSA)	0,1%	Sigma
Penicilina/Estreptomicina	100 U/mL /100 µg/mL	Gibco

#### 4.4. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi utilizada como ponto de checagem para prosseguirmos para as etapas seguintes do protocolo. Na Figura 6, temos o desenho esquemático com os dias em que a técnica foi realizada.

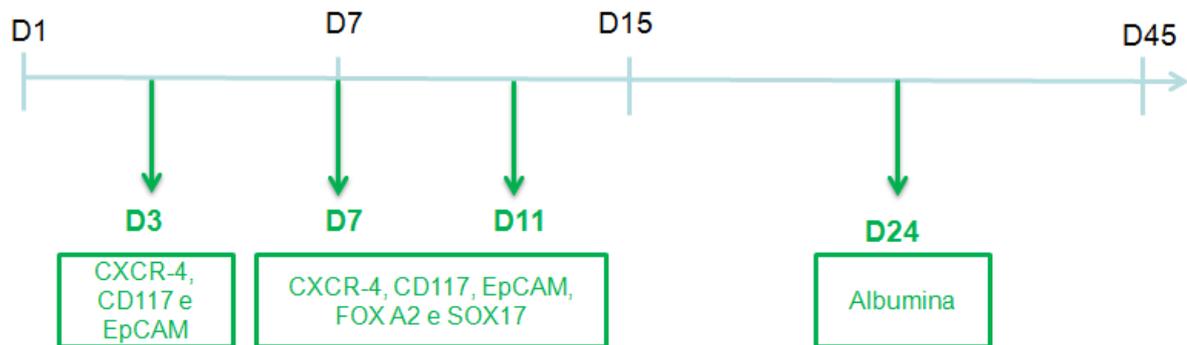


Figura 6: Desenho esquemático dos dias de realização das análises por citometria de fluxo. Estão destacados em verde os dias em que são realizadas as análises e as moléculas a serem investigadas em cada etapa. Onde "D" representa o dia do protocolo.

##### 4.4.1. Marcação de proteínas localizadas na membrana celular

O citômetro de fluxo permite a avaliação de características morfológicas: o SSC (do inglês *Side Scatter*) e FSC (do inglês *Forward Scatter*) das células, além da avaliação de intensidade de fluorescência, que nos proporciona informações

relacionadas às moléculas de interesse. No parâmetro SSC, avalia-se a complexidade e/ou granulosidade das células, pela presença de núcleo, organelas e rugosidade da membrana celular, por exemplo. No parâmetro FSC, avalia-se o tamanho relativo da população celular. A avaliação da expressão de moléculas específicas de nosso interesse é feita pela intensidade de fluorescência atribuída à anticorpos fluorocromados contra nossos alvos de estudo. Desta forma, a presença ou ausência de deslocamento de fluorescência para estas moléculas determinam o perfil fenotípico da amostra.

A fim de sabermos o perfil fenotípico da linhagem HES2, realizamos a avaliação das moléculas: CXCR-4, CD117, EpCAM, FOX A2 e SOX17 por citometria de fluxo quando estas eram mantidas em condições basais de cultivo e expansão. Esta análise foi denominada de “D0”.

No terceiro e sétimo dias do protocolo, as células encontravam-se como aglomerados celulares - os EBs - e para avaliá-las fenotipicamente foi necessário desenvolver um protocolo eficiente de digestão. Os EBs foram coletados da placa com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocados em eppendorf até que decantassem. Depois, o sobrenadante foi retirado lentamente com uma pipeta Pasteur e desprezado, ficando os EBs depositados no fundo do eppendorf. Para a digestão foram testados, os seguintes protocolos:

- **Tripsina-EDTA 0,25%:** Os EBs foram colocados em contato com a solução (500  $\mu$ L) por cerca de três minutos. Em seguida, a inativação da enzima foi feita com meio de cultura DMEM, 50% de SFB e DNase (2 U/ $\mu$ L). A DNase é utilizada para evitar a degradação da molécula de DNA ao longo do processo.
- **Tryple:** Foram colocados 500  $\mu$ L de Tryple sobre os EBs por cerca de três minutos. Posteriormente, colocou-se meio de cultura DMEM, 50% de SFB e DNase (2 U/ $\mu$ L) para a inativação.
- **Desagregação mecânica:** Esta etapa foi realizada colocando-se PBS e, com o auxílio de uma pipeta P200, repetindo por cerca de dez vezes a pipetagem dos EBs.
- **Colagenase I/ Tripsina-EDTA 0,25%:** As células foram submetidas à digestão em 500  $\mu$ L de solução de Colagenase tipo I por 15 minutos a 37°C. Depois, o sobrenadante foi desprezado e colocamos 500  $\mu$ L de solução de Tripsina-EDTA

0,25% por cerca de trinta segundos. Para a inativação da enzima, foi utilizado meio de cultura DMEM, 50% de SFB e DNase (2 U/ $\mu$ L).

A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 15 minutos a 4°C. Descartado o sobrenadante, as células foram incubadas com 100  $\mu$ L de *Fixable Viability Stain* (FVS, BD Biosciences) na diluição 1:1000 por 20 minutos para avaliação da viabilidade celular. Decorrido este tempo, foi realizada a lavagem com 500  $\mu$ L de PBS. Cada tubo foi ressuspendido em 100  $\mu$ L de PBS.

Após este processo, as células foram adquiridas no citômetro de fluxo BD ACCURI para avaliação de qual método seria o mais efetivo. Realizada esta escolha, seguimos para marcação dos nossos alvos de interesse.

Desta forma, as células foram submetidas a marcação para identificação das seguintes moléculas: CXCR-4, CD117 e EpCAM. Os anticorpos foram diluídos segundo combinações de 3  $\mu$ L de cada monoclonal para 100  $\mu$ L de suspensão, conforme recomendação do fabricante. As amostras foram incubadas por 20 minutos, ao abrigo de luz a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com 500  $\mu$ L de PBS e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100  $\mu$ L de PBS.

Para determinar a autofluorescência das células foi necessário realizar a aquisição de células não marcadas. O controle negativo foi determinado utilizando controles isotipos de marcação. A aquisição das amostras foi feita no equipamento Accuri C6 e as análises foram realizadas utilizando o software FlowJo versão X.1.

#### **4.4.2. Marcação de proteínas intracelulares**

Antígenos intracelulares exigem que as células sejam fixadas e posteriormente permeabilizadas antes que o protocolo de marcação antígeno-anticorpo seja realizado. Assim, para a etapa de fixação, após a etapa de incubação com o FVS descrita anteriormente, as células foram lavadas e fixadas com 500  $\mu$ L de solução de paraformaldeído (VETEC) diluído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Foram testadas duas concentrações de paraformaldeído: 1% e 4%.

Depois, as células passaram por nova lavagem com PBS e foram submetidas à permeabilização da membrana celular. Elas foram incubadas, por 20 minutos a temperatura ambiente, em 500  $\mu$ L de solução de Triton (Sigma) diluído em PBS. Foram testadas duas concentrações de Triton: 0,1% e 0,3%. Após a lavagem com

PBS, as células foram incubadas com anticorpos específicos para avaliação das moléculas FOXA2 e SOX17 por 20 minutos, ao abrigo da luz e sob refrigeração. Após a incubação, as células foram lavadas com 500 µL de PBS centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS.

A aquisição das amostras foi feita no equipamento Accuri C6 e as análises foram realizadas utilizando o software FlowJo versão X.1.

#### 4.4.3. Marcação de Albumina

Para a verificação da expressão de albumina, os procedimentos previamente descritos para fixação e permeabilização foram repetidos. Posteriormente, a amostra foi dividida em três tubos, contendo 100 µL cada:

- Tubo branco: sem adição de anticorpos, para avaliação de auto-fluorescência.
- Tubo somente com o anticorpo secundário (Alexa fluor 488 *donkey anti sheep* IgG, Invitrogen, catálogo A11015): para identificar as ligações inespecíficas. O possível deslocamento de fluorescência registrado nesta leitura foi considerado inespecífico, sendo utilizado como controle negativo de marcação. Desta forma, somente deslocamentos superiores ao registrado neste tubo foram considerados positivos, ou seja, garantimos que a fluorescência registrada no tubo contendo os anticorpos primário e secundário seja específica para a albumina humana.
- Tubo contendo os anticorpos primário (*Sheep pAb to human serum*, Abcam, catálogo Ab8940) e secundário (Alexa fluor 488 *donkey anti sheep* IgG, Invitrogen, catálogo A11015).

O anticorpo primário (diluição 1:100) foi colocado no tubo correspondente e incubou-se por 30 minutos a 4°C. Em seguida, lavou-se com PBS e centrifugou-se a 300 x g por cinco minutos a 4°C.

Para a marcação do anticorpo secundário, fez-se a diluição 1:400 em PBS. Os tubos foram incubados por 20 minutos a 4°C. Em seguida, realizou-se a lavagem com PBS e o precipitado celular foi ressuspensado em 100 µL da mesma solução.

A aquisição das amostras foi realizada no equipamento Accuri C6 e as análises foram realizadas utilizando o software FlowJo versão X.1.

#### 4.5. Avaliação da produção de albumina por ELISA

Para a avaliação da produção de albumina pelos hepatócitos gerados em nosso protocolo foi realizado o ensaio ELISA do tipo sanduíche, utilizando o *Human Albumin ELISA Kit* (Bethyl Laboratories, catálogo E88-129). O sobrenadante das células foi coletado no 24º dia de cultivo e congelado em freezer a 80 graus negativos até a realização do teste.

Como controle negativo, utilizamos o sobrenadante da linhagem HES2, antes da diferenciação (D0). Como controle positivo, foi utilizada a linhagem celular humana HepG2, que já fazia parte do acervo do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular. Esta linhagem foi isolada de hepatocarcinoma e produz albumina (Formulário do Produto disponível em <https://www.atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>. Consultado em 05/07/2017).

A placa do kit contém anticorpos anti-albumina humana adsorvidos. Sendo assim, o procedimento iniciou-se com a diluição, em tampão de diluição C (próprio do kit) 1:2 das amostras a serem testadas. Foram adicionados 100 µL das amostras (em duplicata) por poço da placa de ELISA para incubação à temperatura ambiente por 1 hora.

Para a curva padrão, a albumina integrante do kit foi diluída nas seguintes concentrações, conforme orientação do fabricante: 500; 167; 55,6; 18,5; 6,17; 2,06; 0,69 ng/mL.

Passado este período, a placa foi lavada por 4 vezes com a solução de lavagem contida no kit. Depois, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção anti-albumina (previamente diluído conforme instruções do fabricante) e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a placa passou por quatro lavagens com a solução de lavagem do kit.

Foram adicionados 100 µL da solução de *streptavidin-conjugated horseradish peroxidase* (SA-HRP) em cada poço. O período de incubação desta etapa foi de 30 minutos, seguido por quatro lavagens com a solução própria do kit. Adicionou-se, então, 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina) e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos. Esta reação foi paralisada pela adição de 100 µL da Stop Solution em cada poço.

A solução SA-HRP catalisa a reação colorimétrica com o TMB. A reação colorimétrica dá origem a um produto azul que se torna amarelo com a adição da

*Stop Solution*, que contém ácido sulfúrico. A intensidade da coloração está diretamente relacionada com a quantidade de albumina da amostra.

A leitura das amostras foi realizada por espectrofotometria. Esse procedimento analítico nos permitiu determinar a concentração de albumina mediante a absorção de luz. Uma solução quando iluminada por luz branca, apresenta uma cor que é resultante da absorção relativa dos vários comprimentos de onda que a compõem, que pode ser analisados por um espectrofotômetro. O resultado final da nossa reação é uma solução amarela, o que significa que a cor absorvida é o azul, sua cor complementar. Para a realização da leitura no espectrofotômetro, utilizamos a luz absorvida e não a refletida, por este motivo realizamos a leitura a 450 nm (equipamento SpectraMax M3), comprimento de onda correspondente à cor azul.

A curva padrão foi construída utilizando os valores fornecidos na leitura do espectrômetro em função da concentração de albumina, que variou de 0,69 a 500 ng/mL, com fator de diluição de 3, proporcionando desta forma a leitura de 7 pontos para construção da mesma. Realizamos a regressão linear da curva no programa *GraphPad Prism* onde foi calculada a equação da reta. Para determinarmos os valores das concentrações de albumina das amostras, utilizamos a equação da reta colocando os valores obtidos da leitura do espectrofotômetro para cada condição analisada.

Os valores de controle negativo, controle positivo e das diferenciações (hep-HES2) foram submetidos a testes estatísticos descritos no item 4.7 para avaliarmos se havia diferença significativa entre eles.

#### **4.6. Avaliação da presença de micoplasmas**

A presença de micoplasmas nas culturas celulares foi avaliada pela técnica de PCR *nested* utilizando o kit PCR *Mycoplasma Detection Set* (Takahara Bio Inc, catálogo 6601). Avaliar a presença desses micro-organismos na cultura de células é essencial pois eles podem provocar alterações na taxa de crescimento, na morfologia, no metabolismo e aberrações cromossômicas, interferindo nos resultados dos experimentos (DREXLER; UPHOFF, 2002).

O PCR *nested* ocorre em duas etapas e apresenta melhor especificidade e eficiência, especialmente para os casos onde o alvo da amplificação está presente em baixa concentração no material analisado. O primeiro par de primers amplifica

uma região mais ampla. O segundo par de primers liga-se à uma região do produto do primeiro PCR. Os primers utilizados na primeira e na segunda reação deste teste de detecção de micoplasmas estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10: Primers da avaliação da presença de micoplasmas**

Primer	Sequência de <i>primers</i> senso (5'-3') e anti-senso (3'-5')
<b>Mico1 (Utilizados na primeira reação de PCR)</b>	5' - ACACCATGGGAGCTGGTAAT - 3' 5' - CTTTCATCGACTTTCAGA-CCCAAGGCAT - 3'
<b>Mico2 (Utilizados na segunda reação de PCR)</b>	5' - GTTCTTTGAAAAGTGAAT - 3' 5' - GCATCCACCAAAAAGTCT - 3'

O kit utilizado baseia-se na amplificação de uma sequência de nucleotídeos que é altamente conservada em diversas espécies de micoplasmas, região 16S e 23S do RNA ribossomal fornecendo maior especificidade, já que não permite a amplificação de DNA de outra origem, como das células cultivadas, por exemplo. O esquema ilustrativo da técnica está na Figura 7.

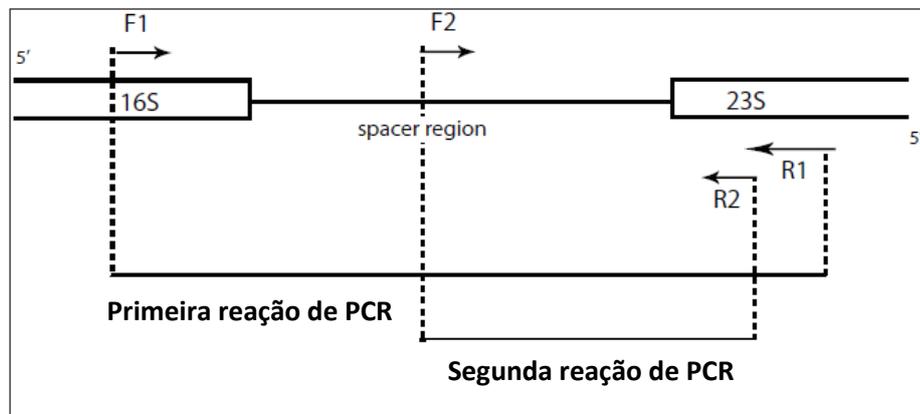


Figura 7: Esquema representativo da técnica PCR *nested* utilizada para avaliação da presença de micoplasmas nas células em cultivo. As representações F1 (sequência de *primer* senso, *forward*) e R1 (sequência de *primer* anti-senso, *reverse*) correspondem aos locais de ligação dos iniciadores na primeira reação. Já, F2 e R2 correspondem aos locais de ligação dos iniciadores na segunda reação. 16S e 23S correspondem à sequência de nucleotídeos altamente conservada no RNA ribossomal dos micoplasmas. Figura adaptada do manual do fabricante.

Com o kit PCR *Mycoplasma Detection Set* é possível a detecção das seguintes espécies: *Mycoplasma fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. hyopneumoniae*, *M. capricolum* e *Ureaplasma urealyticum*.

Foi avaliada mensalmente a presença de micoplasmas na linhagem HES2. Iniciado o ciclo de diferenciação, as células passaram pela avaliação, ao menos duas vezes ao longo do processo.

Para a realização do teste, foi retirado 1  $\mu\text{L}$  do meio de cultura em contato com as células por no mínimo 24 horas de acordo com as instruções do fabricante. Para a primeira reação, foram adicionados: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação; 0,2 mM de mistura de dNTP (Invitrogen); 52,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4  $\mu\text{M}$  de cada primer; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Amplitaq Gold®, Life Technologies) e água apirogênica até completar o volume de 25  $\mu\text{L}$ . As amostras foram submetidas ao seguinte ciclo:

- 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos: etapa de desnaturação, abertura da fita de DNA.
- 55°C por 2 minutos: etapa de anelamento, onde os *primers* se ligam à fita-molde.
- 72°C por 1 minuto: fase de extensão, onde a enzima Taq polimerase alonga as novas fitas de DNA formadas.

Para a segunda reação, foram utilizados: 1  $\mu\text{L}$  do resultado da primeira reação de PCR; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação; 0,2 mM de mistura de dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4  $\mu\text{M}$  de cada iniciador; 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e água apirogênica até completar o volume de 25  $\mu\text{L}$ . As amostras foram submetidas às seguintes condições de termociclagem: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto.

Para a eletroforese, uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  da segunda amplificação foi aplicada em gel de agarose a 1% em tampão TBE (tampão Tris/Borato/EDTA). Foi adicionado ao gel o intercalante de ácidos nucleicos SYBR Safe (Invitrogen) na proporção de 1:30.000 (v/v). O gel foi submetido a uma diferença de potencial de 80 V e após a eletroforese o gel foi excitado a 800 nm no fotodocumentador Odyssey Fc (Li-Cor) para a detecção das bandas de DNA.

Como controle positivo foi utilizada a amostra sintética do kit específica para esta finalidade. Ao correr o gel, este controle positivo mostra duas diferentes bandas que indicam que as duas reações de PCR ocorreram satisfatoriamente e os *primers* utilizados estão funcionando. O peso molecular do controle positivo é superior aos das espécies de micoplasmas existentes, sendo ele um controle de qualidade da reação.

Como controle negativo foi usada água apirogênica. Ambos os controles foram submetidos às mesmas reações que as amostras testadas. Os resultados dos testes foram interpretados como negativos quando a amostra e o controle negativo não apresentavam amplificação de DNA.

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os dados da curva padrão de albumina foram submetidos à regressão linear. Obtivemos a equação da reta e o valor de  $R^2$ . O valor de  $R^2$  é o coeficiente de determinação da reta que mede o ajustamento da regressão linear, indicando a porcentagem dos valores que podem ser explicados por este modelo estatístico.

Os dados referentes a imunofenotipagem e concentração de albumina nas hep-HES2 foram representados como média  $\pm$  desvio-padrão. Comparações entre 3 grupos, em diversos pontos, foram feitas pelo Teste *one way* ANOVA (Análise de Variância de uma via). Foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Em todos os testes, o grau mínimo de significância considerado foi 95% ( $p < 0,05$ ) e os cálculos foram realizados no computador utilizando o programa *GraphPad Prism*® versão 7.0.

## **5. Resultados**

### **5.1. Obtenção de MEF**

O processo utilizado para a obtenção da MEF resultou no congelamento de 210 criotubos com 2 milhões de células cada. Esse quantitativo foi obtido a partir de cincoembriões. Após o descongelamento, a média de viabilidade foi de 96,2%, tendo sido realizadas quatro diluições em Azul de Trypan, duas de cada tubo onde as células foram irradiadas. As células apresentaram morfologia característica fibroblastoide com prolongamentos extensos (Figura 8).

Após um período mínimo de 24 horas em cultura, as células foram submetidas a teste para a avaliação da presença de micoplasmas que teve resultado negativo (Figura 9).

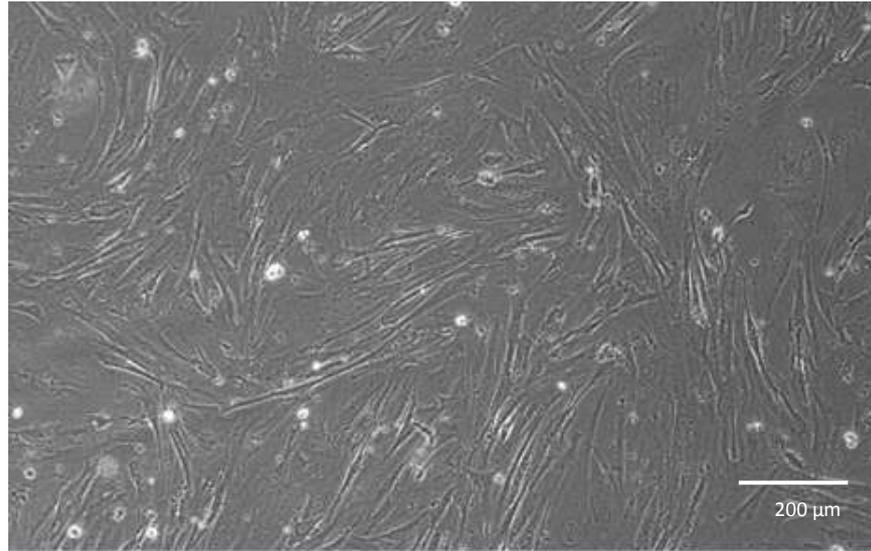


Figura 8: Microscopia de campo claro representativa de fibroblastos de embriões de camundongos. As células apresentam morfologia fibroblastoide e longos prolongamentos. A imagem foi adquirida após o processo de irradiação e descongelamento após 24 horas de cultivo. Barra de calibração: 200  $\mu\text{m}$ .

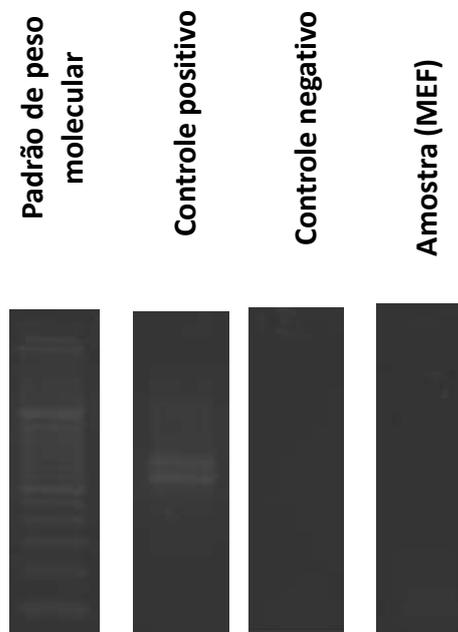


Figura 9: Avaliação da presença de micoplasmas por PCR. À esquerda, o padrão de peso molecular, seguido dos controles positivo e negativo (água apirogênica). Por último o sobrenadante do cultivo de fibroblastos de embriões de camundongos (MEF) após o descongelamento, em 24 horas de cultivo.

## 5.2. Cultivo e expansão da linhagem HES2

A linhagem HES2 foi descongelada sobre a camada de MEF. As células da HES2 organizaram-se em colônias com bordas delimitadas. Elas apresentavam elevada razão núcleo-citoplasma e núcleo centralizado. Um indicativo da manutenção das características embrionárias foi o delineamento das bordas e a morfologia das componentes da colônia.

Para o início da diferenciação as células estavam com cerca de 90% de confluência, processo que levou entre cinco e sete dias para ocorrer (Figura 10).

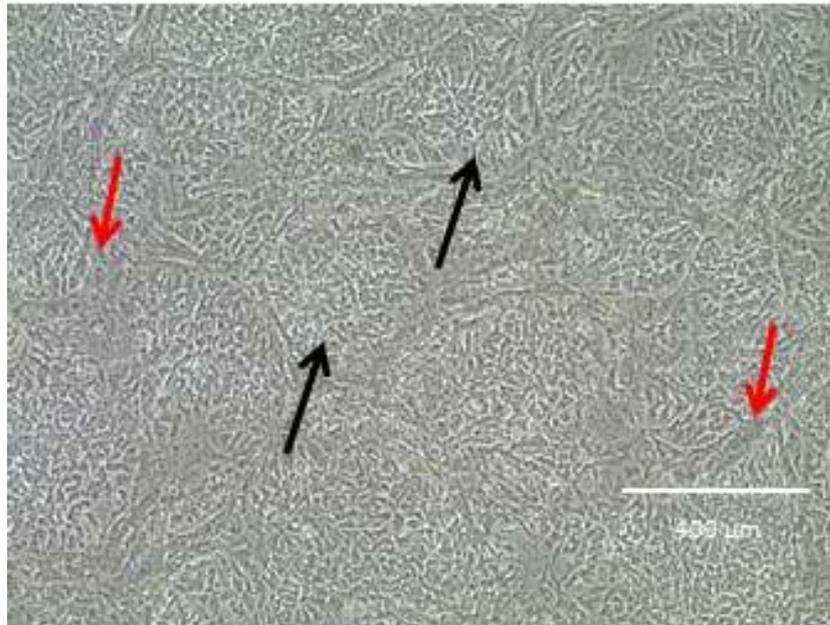


Figura 10: Microscopia de campo claro do cultivo da linhagem HES2 cultivada sobre camada de MEF. As células MEF (indicadas em vermelho) apresentam morfologia alongada, característica dos fibroblastos. Já a linhagem HES2 (indicada em preto) organiza-se em colônias de bordas delimitadas. Barra de calibração: 400  $\mu\text{m}$ .

Com o intuito de traçar um perfil imunofenotípico da linhagem HES2 em relação aos marcadores de endoderma utilizados ao longo do protocolo, realizamos a citometria de fluxo antes do início da diferenciação (Figura 11). As análises nos mostraram que a linhagem HES2 expressa EpCAM, porém é majoritariamente negativa para CXCR4, CD117, FOXA2 e SOX17.

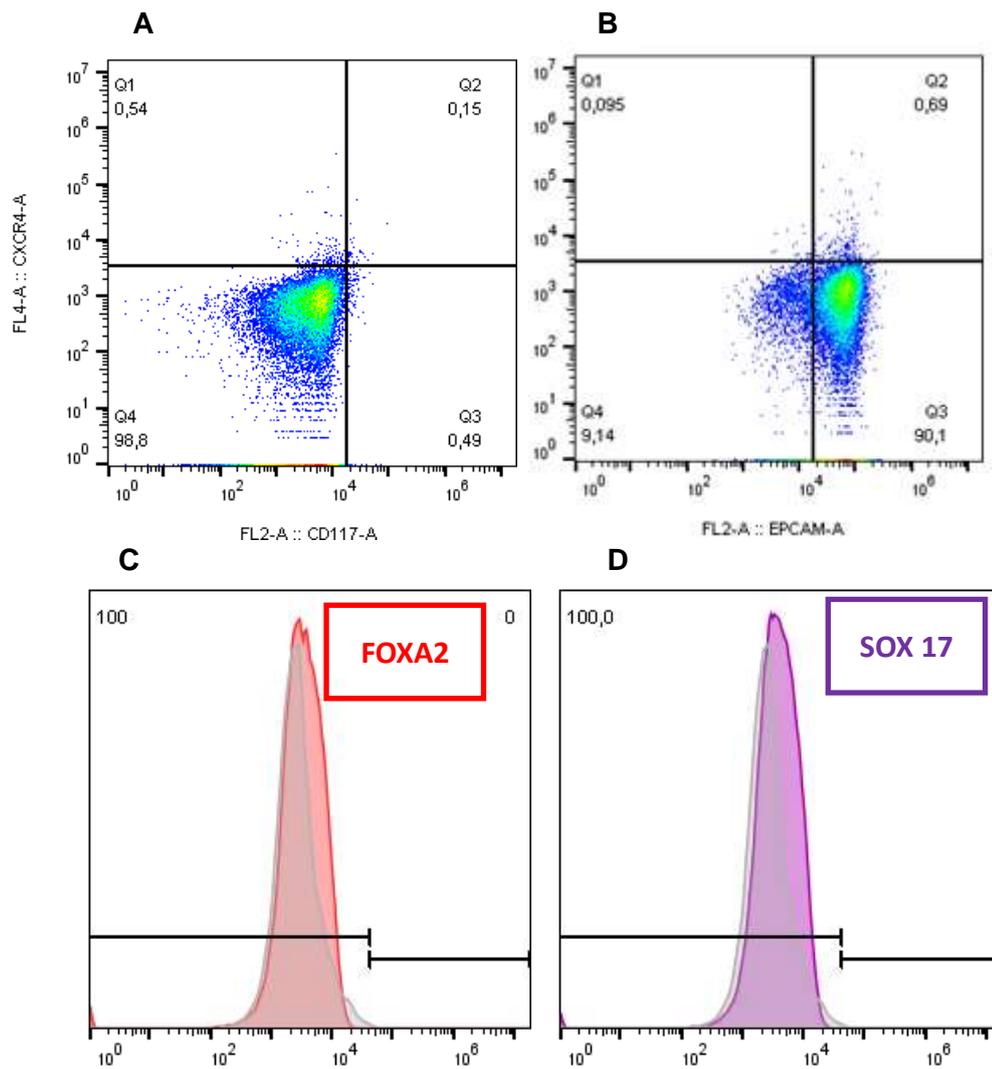


Figura 11: Perfil imunofenotípico da linhagem HES2 em relação aos marcadores de endoderma. Em A, temos um histograma representativo da expressão de CXCR4 e CD117, onde não observamos a expressão dessas moléculas na linhagem. Em B, o histograma representativo da expressão de CXCR4 e EpCAM mostra que há expressão de EpCAM na linhagem. A análise dos fatores de transcrição FOX A2 e SOX17, indicam que essas moléculas não são expressas na linhagem HES2 (C e D).

### 5.3. Diferenciação da linhagem embrionária HES2 em hepatócitos

#### 5.3.1. Agregação de EBs

Para a dissociação inicial das células HES2 foram testadas as seguintes soluções: Tripsina – EDTA 0,25% e Tryple. O tempo de dissociação ideal para que a obtenção de EBs fosse bem sucedida também foi adaptado. Obtivemos melhor resultado com a dissociação realizada com Tripsina-EDTA 0,25% em contato com as células por cerca de três minutos, até que as observássemos bem redondas, morfologia característica de células não espalhadas. Cabe destacar que não as

deixamos em contato com a solução até que a monocamada se desprendesse sozinha da placa.

Observamos que essa etapa foi muito importante para o sucesso da agregação dos EBs, pois quando a digestão foi excessiva não houve a formação de EBs (Figura 12 - A).

Estabelecidas as condições para a dissociação, após a agregação e incubação por 24 horas sob agitação, os EBs gerados organizaram-se em pequenos aglomerados celulares de morfologia arredondada (Figura 12 - B).

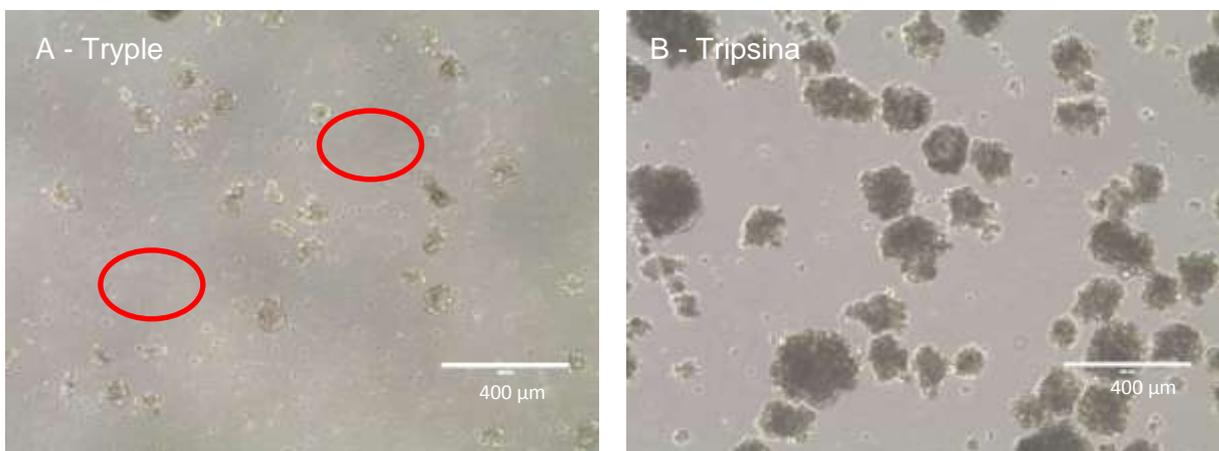


Figura 12: Microscopia de campo claro realizada no segundo dia de protocolo de diferenciação. Em A, temos a agregação realizada após dissociação com Tryple em contato com as células até que a monocamada se desprendesse. Observamos que não há formação de EBs e há uma grande quantidade de células mortas (indicadas pelo círculo vermelho) causado pelo excessivo tempo de digestão. Em B, os agregados formados após o ajuste do protocolo, com maior número de células que formaram pequenos agregados celulares. Também é possível observar a redução do número de células mortas. Barra de calibração: 400  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.2. Indução do endoderma

A segunda etapa do protocolo foi a indução do endoderma, entre o segundo e sétimo dia. No terceiro dia, os aglomerados celulares já apresentavam tamanho aumentado e as bordas aspecto mais delimitado (Figura 13).

Neste mesmo dia foi realizada uma avaliação imunofenotípica dos EBs, onde foram observadas baixa expressão das duplas populações: CXCR4/ EpCAM positivas e CXCR4/CD117 positivas (Figura 14). Este resultado demonstra que nesta etapa as células encontram-se na etapa da transição epitélio-mesenquimal, onde as células perdem a expressão de EpCAM.

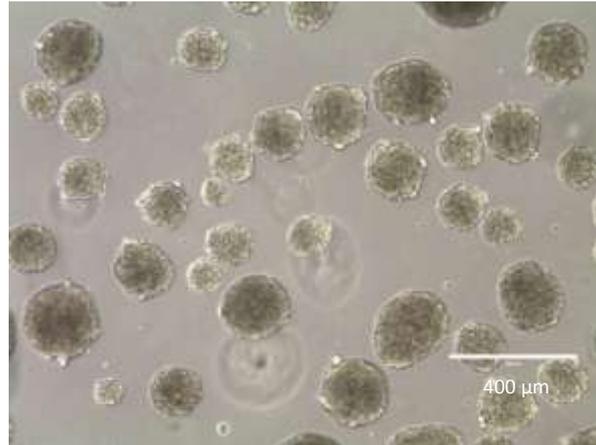


Figura 13: Microscopia de campo claro do terceiro dia da diferenciação celular. Observamos corpos embrioides com tamanho mais homogêneo e bordas bem delimitadas.

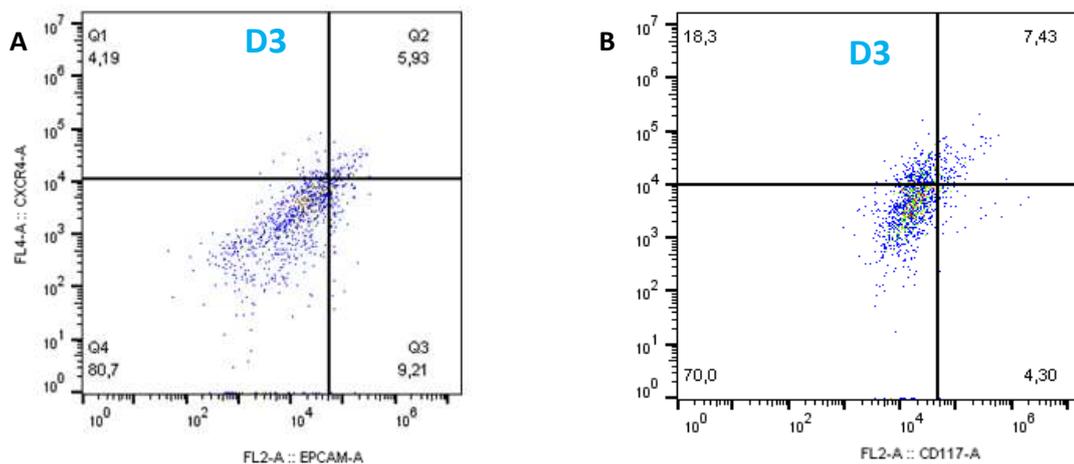


Figura 14: Dotplots representativos do terceiro dia de cultivo. Em A, vemos que a população duplo-positiva para os marcadores de endoderma CXCR4 e EpCAM representa 5,93%. Em B, a população duplo-positiva para as moléculas CXCR4 e CD117 corresponde a 7,43%. Estes resultados mostram que as células estão na transição epitélio-mesenquimal, onde há perda da expressão da molécula EpCAM.

No sétimo dia do protocolo, observamos o aumento do tamanho dos agregados celulares que apresentavam aspecto mais denso e com bordas mais delimitadas (Figura 15).

No último dia da indução do endoderma, avaliamos novamente a expressão dos marcadores desse folheto embrionário (Figura 16). Observamos população majoritariamente positiva para os marcadores e o aumento da expressão dessas moléculas associadas nos permitiu concluir que a geração do endoderma havia sido alcançada.

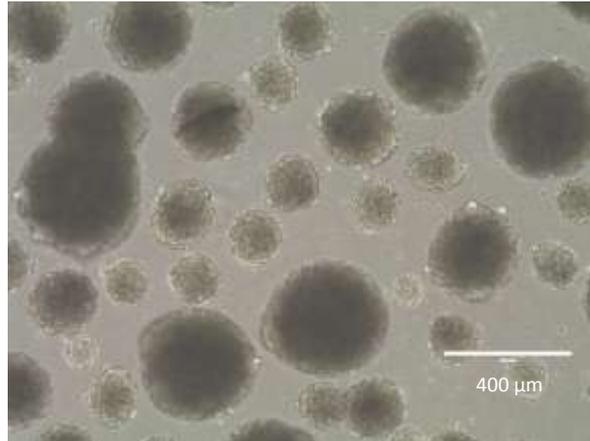


Figura 15: Fotomicrografia representativa do sétimo dia de cultivo. Observamos maior número de células em cada aglomerado, se comparado ao registrado no terceiro dia do protocolo e as bordas bem delimitadas. Imagem adquirida por microscopia de campo claro. Barra de calibração: 400  $\mu\text{m}$ .

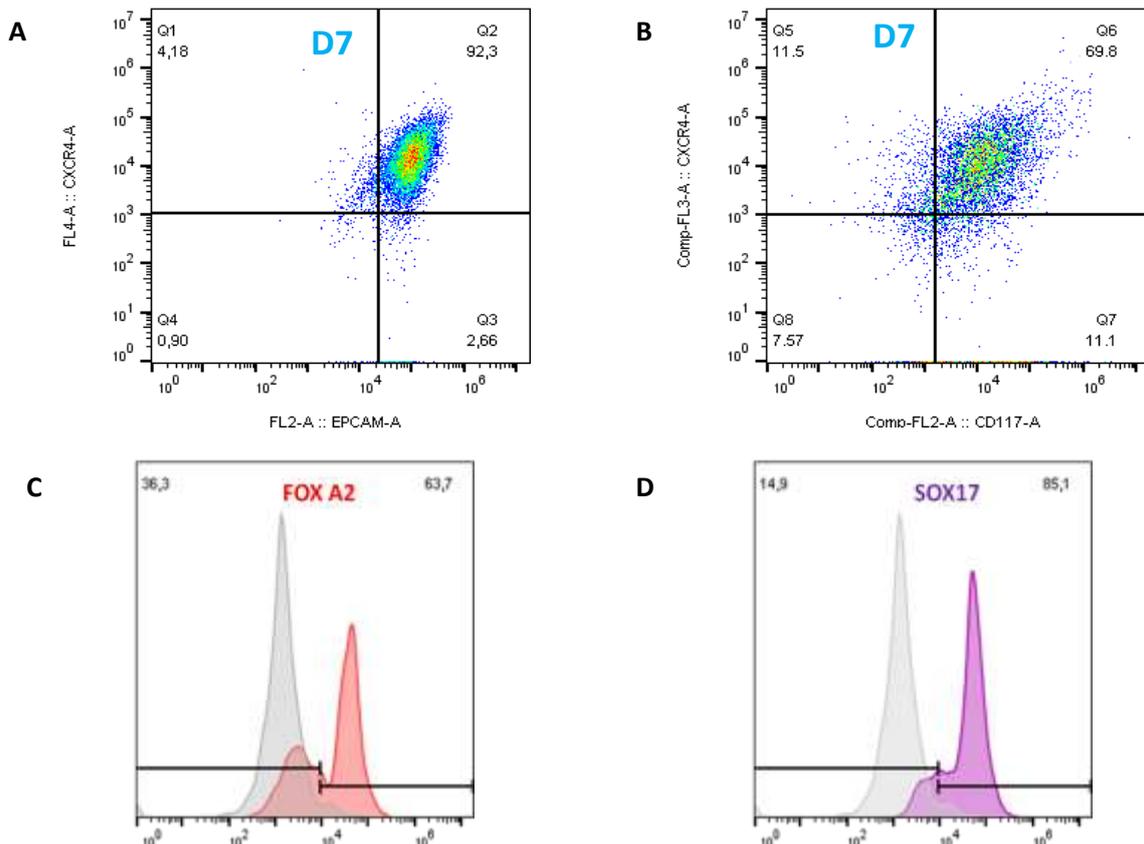


Figura 16: Perfil imunofenotípico representativo dos marcadores de endoderma no sétimo dia de cultivo em relação. Em A, observamos população CXCR4/ EpcAM positiva de 92,3%. Em B, a porcentagem de células expressando CXCR4/ CD117 simultaneamente é 69,8%. Em C, o histograma representativo mostra que 63,7% das células expressavam FOXA2. Já em D, vemos que 85,1% da população expressavam o fator de transcrição SOX17. O ganho dessas moléculas ao longo desta etapa nos permitiu concluir que o endoderma foi gerado, sendo possível seguir para a próxima fase do protocolo.

### 5.3.3. Especificação hepática

No sétimo dia, os EBs passaram por digestão com as diferentes soluções: Tripsina-EDTA 0,25%, Tryple e Colagenase I/ Tripsina-EDTA 0,25%. As células foram plaqueadas (concentração de  $5 \times 10^5$  células/ mL) sobre placa de 12 poços (área de  $3,7 \text{ cm}^2$  por poço) previamente tratada com matrigel. Os resultados referentes ao dia subsequente às digestões (D8) utilizando Tryple e Tripsina/ EDTA 0,25% por cerca de 4 minutos estão representados na Figura 17.

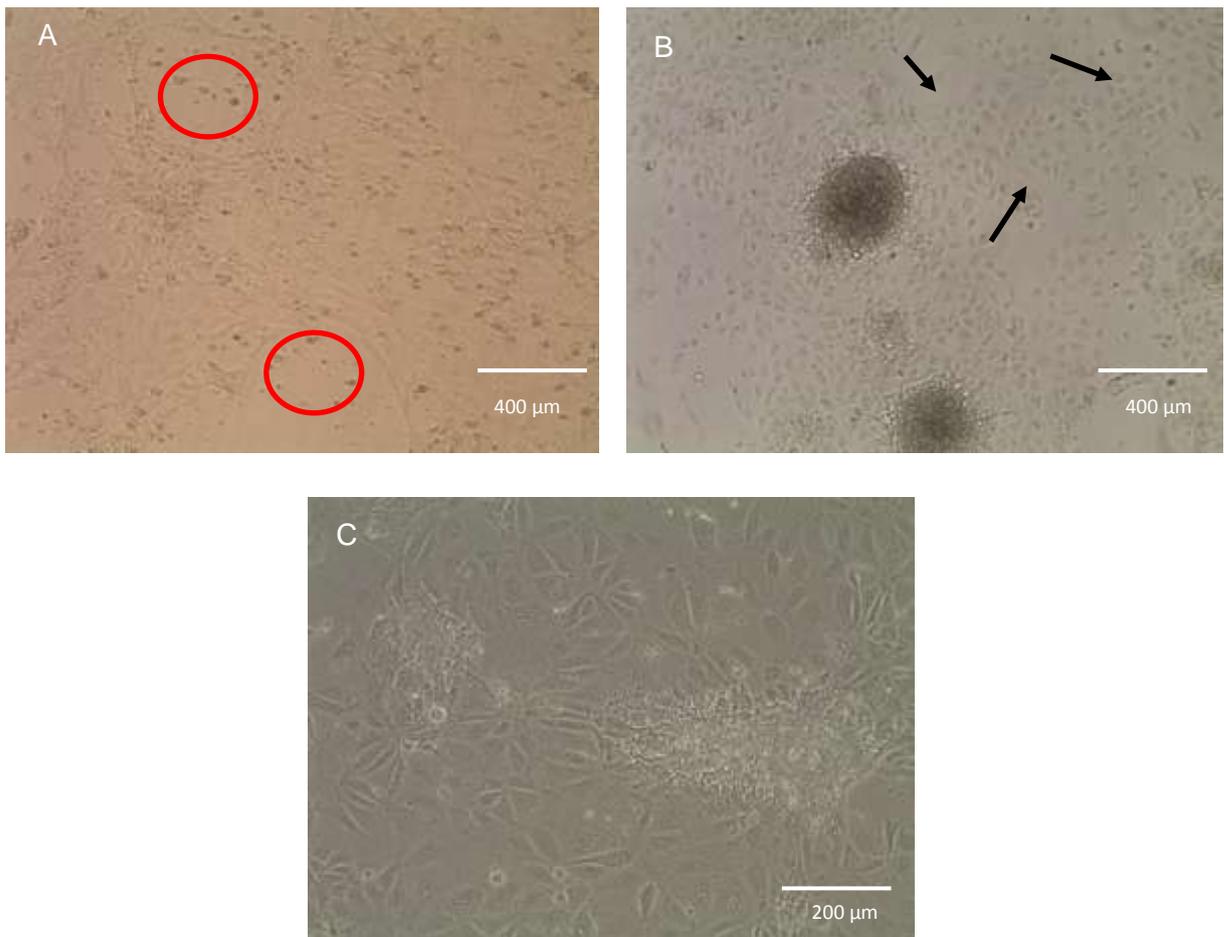


Figura 17: Fotomicrografias representativas do oitavo dia de cultivo. Em A, as células após digestão com Tripsina-EDTA 0,25% por 4 minutos. É possível observar muitas células mortas (exemplificadas pelo destaque em vermelho). Em B, outro cultivo onde a digestão com Tryple por 4 minutos foi insuficiente para que os EBs fossem digeridos. No entanto, as células espalhadas apresentam boa morfologia poligonal (indicadas por setas pretas). Em C, detalhe em maior aumento do cultivo sob a condição descrita em B. Imagens adquiridas por microscopia de campo claro.

Obtivemos melhor resultado utilizando a solução de Colagenase I por 20 minutos e depois Tripsina/EDTA 0,25% por cerca de 30 segundos, nessa situação as células formaram uma monocamada confluyente e sem grumos (Figura 18). Foi observado que se, nesta etapa, os agregados não passassem por uma digestão

eficiente, as etapas seguintes seriam prejudicadas. Isto porque as células da parte interna dos grumos morriam por falta de nutrição e prejudicavam o cultivo.

No protocolo descrito por Ogawa e colaboradores (2013), a indução do endoderma ocorreu até o sexto dia do protocolo. Esta avaliação foi feita pelo fenótipo relacionado às moléculas CXCR4, CD117, EpCAM, SOX17 e FOXA2 avaliado por citometria de fluxo. Quando realizamos a indução até o sexto dia, observamos uma expressão insuficiente destas moléculas, sugerindo que neste dia, a formação do endoderma ainda não estava concluída. Por este motivo, mantivemos a indução até o sétimo dia, quando a expressão já estava aumentada.

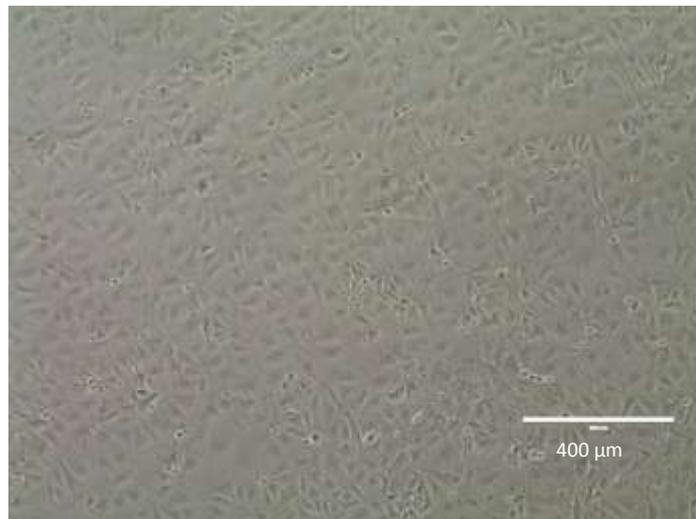


Figura 18: Microscopia de campo claro do oitavo dia de cultivo. Após os ajustes na concentração celular e digestão dos corpos embrioides, as células formaram uma monocamada com morfologia homogênea poligonal. Barra de calibração: 400 µm.

No décimo primeiro dia do protocolo, realizamos nova análise destes marcadores do endoderma a fim de demonstrar que não havia comprometimento ou alteração do fenótipo entre os dias 7 e 11 de cultivo. Os resultados estão demonstrados na Figura 19, onde observamos valores bem semelhantes aos encontrados no sétimo dia do protocolo.

Para melhor entendermos o processo biológico da diferenciação hepática ao mimetizar os processos que ocorrem durante a embriogênese, realizamos a análise temporal de cada um dos marcadores utilizados neste estudo, comparando-os estatisticamente.

A molécula EpCAM está presente na linhagem embrionária HES2. No terceiro dia da diferenciação seu valor é reduzido, pois ocorre a transição epitélio-mesenquimal e as células perdem a expressão dessa molécula (OGAWA et al., 2013). Já em D7, observamos alta expressão de EpCAM que se mantém até o décimo primeiro dia (Figura 20). Foi demonstrado que essa molécula é expressa em progenitores que darão origem a todas as células hepáticas e também em hepatoblastos, que originarão os hepatócitos. Nossos resultados mostraram que a transição da expressão da EpCAM em cultivo mimetizou o que ocorre no desenvolvimento embrionário (WAUTHIER et al., 2008). O aumento da expressão da molécula entre o terceiro e o sétimo dias, é um indicativo da formação do endoderma nessa etapa.

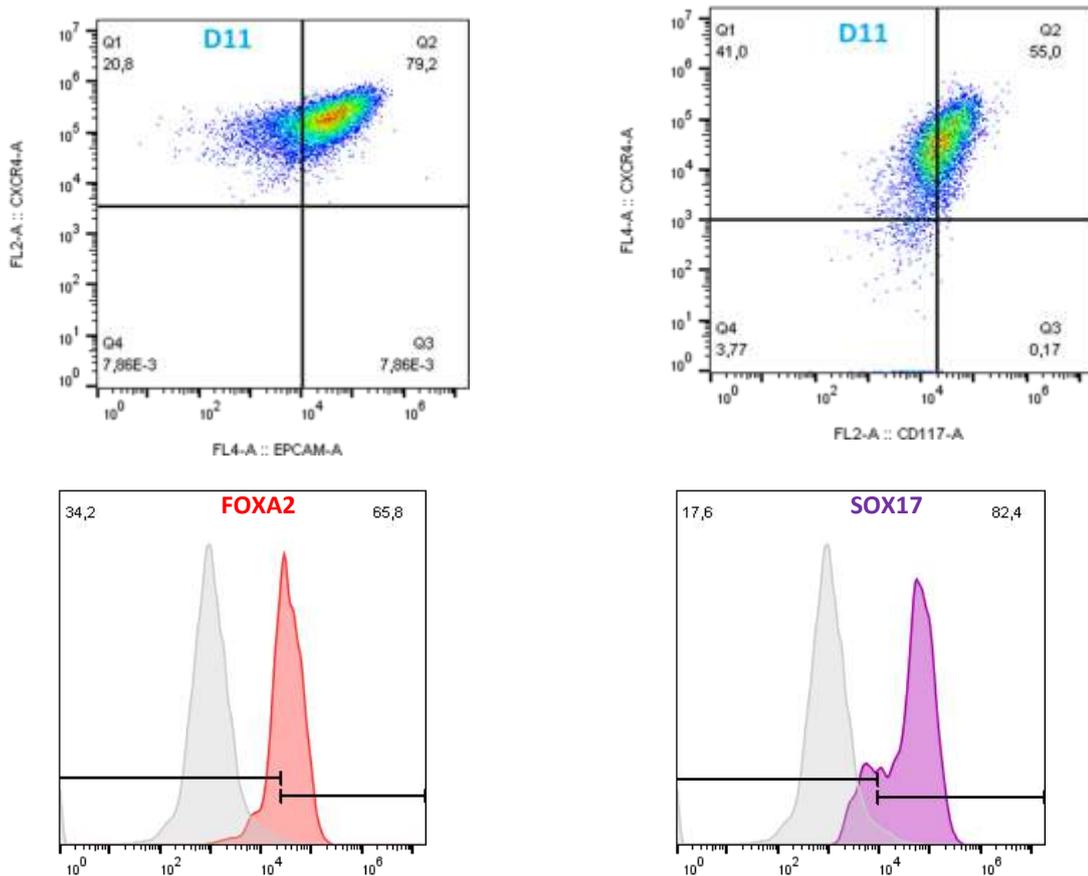


Figura 19: Perfil imunofenotípico representativo dos marcadores do endoderma no décimo primeiro dia de cultivo. Em A, observamos que 79,2% das células expressavam simultaneamente CXCR4/EpCAM. Em B, a porcentagem de células expressando CXCR4/CD117 é de 55%. Em C, o histograma representativo mostra que 65,8% das células expressavam FOXA2. Já em D, vemos que 82,4% da população expressavam o fator de transcrição SOX17.

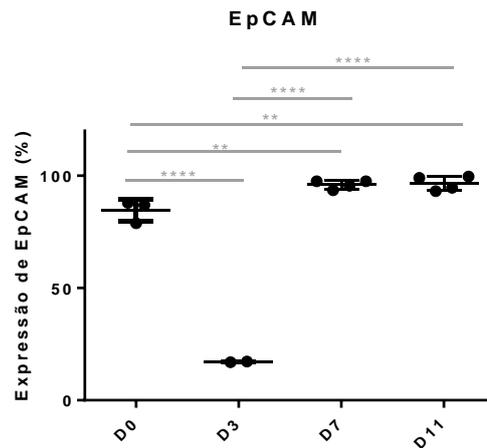


Figura 20: Representação gráfica da análise estatística de EpCAM. A partir da linhagem embrionária (D0), passando ao terceiro (D3), sétimo (D7) e décimo primeiro dias (D11). A expressão da molécula D0 e D3 sofre redução. Depois volta a ser expressa em D7 e se mantém até o D11. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de p: (\*\*)<0,005 e (\*\*\*)<0,0001.

Observamos que a molécula CD117 apresentou aumento da expressão mais tardio (Figura 21). Isso foi evidenciado pela ausência de diferença significativa entre D0, D3 até o sétimo dia do protocolo e significância entre o sétimo e o décimo primeiro dia. O aumento da expressão de CD117 ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário, a partir da formação do endoderma, e é observado até nos progenitores multipotentes hepáticos, que darão origem aos colangiócitos e hepatoblastos, o que explica seu aumento mesmo após a fase de indução do endoderma.

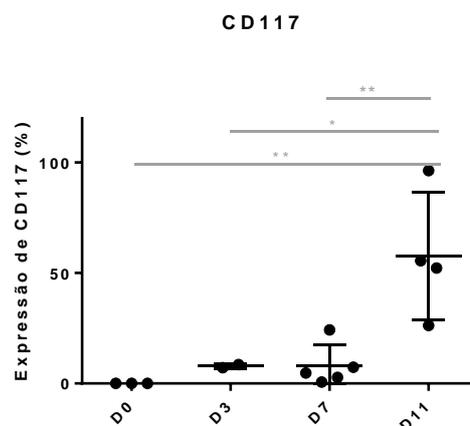


Figura 21: Representação gráfica da análise estatística da expressão de CD117. A molécula não é expressa na linhagem embrionária (D0) e seu aumento só passou a ter significado estatístico no décimo primeiro (D11) dia de cultivo. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de p: (\*)<0,03 e (\*\*)<0,006.

Em relação à molécula CXCR4, observamos diferença significativa de sua expressão entre D3 e D7. Entre o sétimo e o décimo primeiro dias não há diferença estatística significativa. CXCR4 é o principal marcador utilizado como parâmetro para a identificação da geração de endoderma em cultivo. Seu aumento entre o terceiro e o sétimo dias, indica a geração de endoderma no sétimo dia do protocolo.

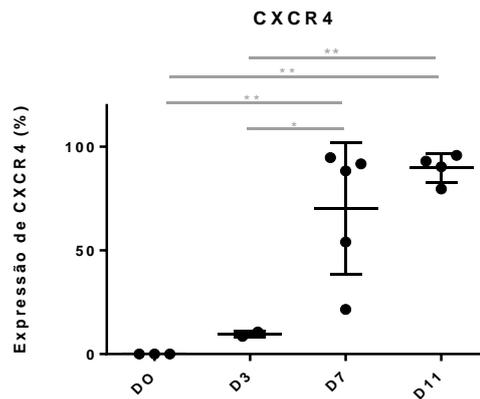


Figura 22: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma CXCR4. A linhagem embrionária (D0) não expressa a molécula, não houve aumento significativo até o terceiro dia (D3). Em D7, há elevação na porcentagem de células expressando a molécula, o que se mantém até D11. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de p: (\*)=0,0324 e (\*\*)<0,007.

A proteína intracelular FOXA2, também apresentou aumento de expressão durante o protocolo, observado na Figura 23. Observamos diferença estatística entre D0, D7 e D11. O aumento da expressão no sétimo dia do protocolo indica a geração do endoderma. O fator de transcrição FOXA2 atua na fase inicial de indução do endoderma e no início da especificação hepática e é um importante marcador na diferenciação hepática. Há evidências de que o fator FOXA2 continua a ser expresso mesmo nas fases mais tardias da diferenciação apesar de sua função nas etapas posteriores à formação do endoderma não serem bem descritas (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015).

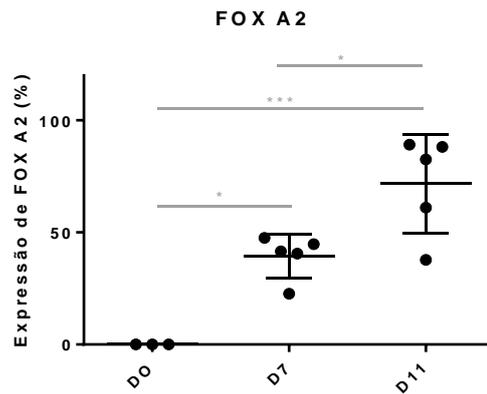


Figura 23: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma FOXA2. A linhagem embrionária (D0) não expressa a molécula, houve aumento significativo até o sétimo (D7) e deste até o décimo primeiro (D11) dia da diferenciação. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de p: (\*) $<0,025$  e (\*\*\*) $=0,0002$ .

A expressão do fator de transcrição SOX17 aumentou até o sétimo dia, não havendo diferença estatística entre D7 e D11 (Figura 24). Seu aumento no sétimo dia é um indicativo da geração do endoderma. Esta molécula está presente nos progenitores hepato-pancreáticos encontrados ao término da formação do endoderma definitivo, o que explica a estagnação na sua expressão.

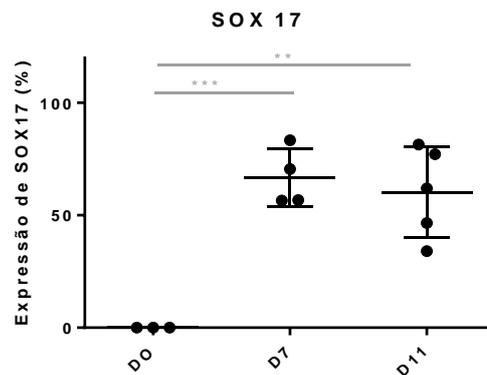


Figura 24: Representação gráfica da análise estatística do marcador de endoderma SOX17. A linhagem embrionária (D0) não expressa a molécula, houve aumento significativo até o sétimo (D7) e estabilização até o décimo primeiro (D11) dia da diferenciação. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de p: (\*\*) $<0,0013$  e (\*\*\*) $=0,0009$ .

Durante a especificação hepática, que ocorre entre o sétimo e o décimo quinto dias, a cultura apresentou reduzida taxa de proliferação. A cultura apresentou aspecto homogêneo com poucas células alongadas e arredondadas - características

que não pertencem aos hepatócitos (Figura 25). A maioria das células apresentou morfologia poligonal, núcleo grande e centralizado e o citoplasma granuloso, características dos hepatoblastos.

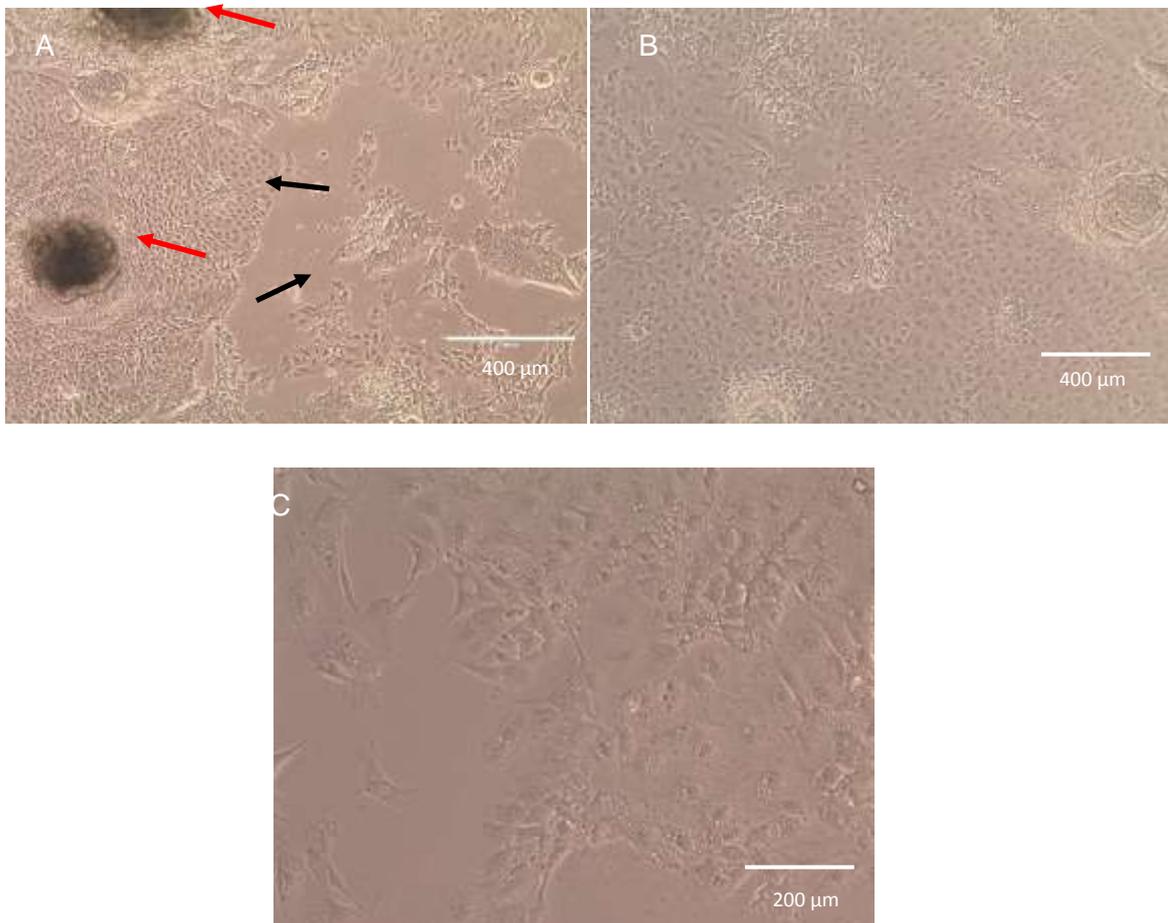


Figura 25: Imagens representativas do décimo quarto dia de cultivo. Em A, vemos o cultivo onde ocorreu dificuldade na dissociação de EBs. Há heterogeneidade morfológica evidenciada principalmente entre as células próximas aos grumos (indicadas em vermelho) e aquelas distantes. Em B, onde a dissociação foi mais eficiente, temos um cultivo mais homogêneo com grumos menores e maior confluência. Imagens adquiridas por microscopia de campo claro. Em C, o destaque em maior aumento, onde é possível observar a granulose do citoplasma e a morfologia poligonal das células em diferenciação.

#### 5.3.4. Maturação hepática

A maturação hepática ocorreu entre o décimo quinto e o quadragésimo quinto dias. Ao longo desta etapa, observamos que as células mantinham a morfologia poligonal, também observada em hepatócitos maduros. Ao realizarmos a passagem enzimática, com Colagenase I por 20 minutos, seguida de Tripsina-EDTA 0,25% por cerca de três minutos, observamos diferenças morfológicas nas células (Figura 26).

As células ficaram muito espaçadas na placa e adquiriram morfologia mais alongada, diferente da descrita para hepatócitos imaturos.

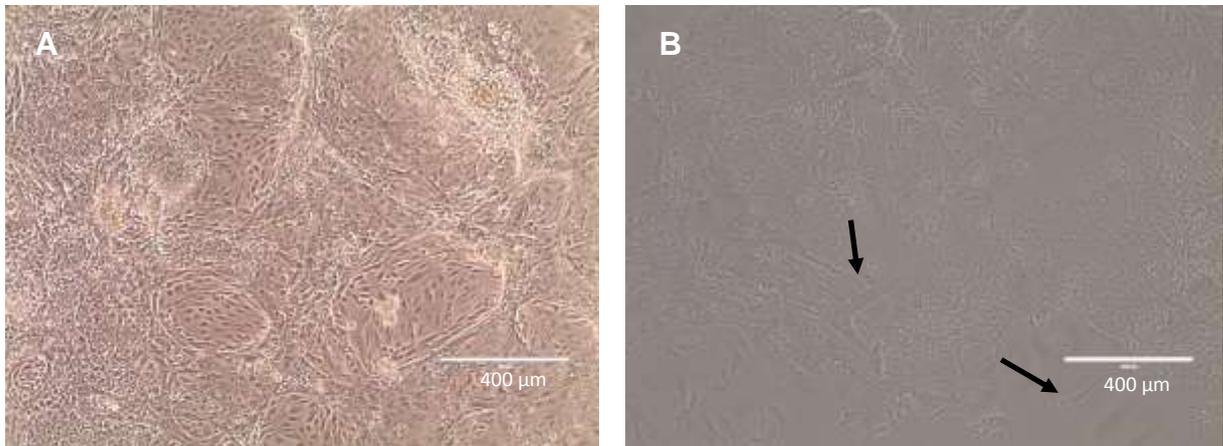


Figura 26: Microscopia de campo claro representativa da fase de maturação hepática. Em A, no décimo sexto dia do cultivo, observamos que as células mantiveram a morfologia poligonal. Em B, no vigésimo primeiro dia, após a realização de uma passagem 1:2, observamos atípicas células alongadas (indicadas em preto) e baixa densidade celular. Barra de calibração: 400 µm.

No vigésimo sexto dia, as células foram submetidas ao cultivo tridimensional. O tempo adequado para a dissociação foi a maior dificuldade desta etapa. A adesão à placa de cultura era muito forte e acabávamos perdendo células durante o procedimento. Obtivemos melhor resultado com a dissociação utilizando Colagenase I por 20 minutos, seguido de Tripsina-EDTA 0,25% por cerca de 3 minutos. As células foram colocadas sob agitação suave por 24 horas. Decorrido este tempo, elas se organizaram em agregados (Figura 27).

No vigésimo quarto dia do protocolo, avaliamos a expressão de albumina por citometria de fluxo. Na Figura 28 A, temos o gráfico correspondente à marcação com o anticorpo secundário acoplado ao fluoróforo Alexa 488. Esta marcação é feita para evitar a quantificação de ligações inespecíficas. Já na Figura 28 B, observamos a marcação das células com o anticorpo primário e secundário, onde confirmamos que aproximadamente 90% das células expressavam albumina. Realizamos também a avaliação da secreção de albumina por ELISA que está detalhada no item 5.5.

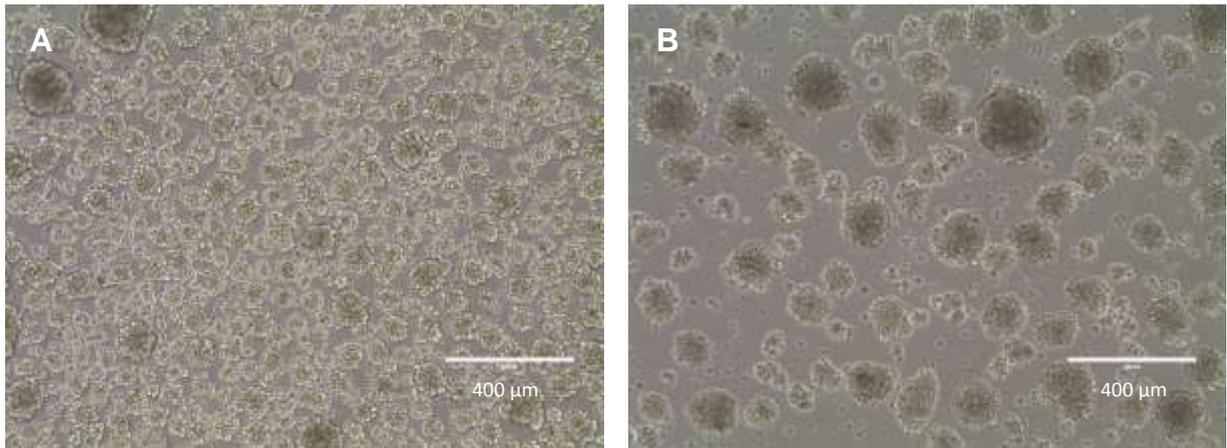


Figura 27: Microscopia de campo claro da maturação hepática em cultivo tridimensional. No vigésimo oitavo dia, observamos muitos agregados pequenos (A). No trigésimo dia, vemos o aumento do tamanho e possível fusão dos agregados (B).

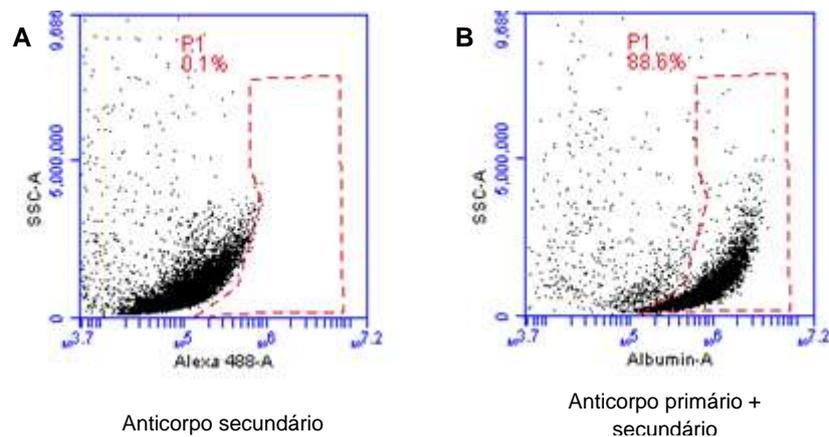


Figura 28: Histograma representativo da análise de expressão de albumina no vigésimo quarto dia do protocolo. Em A, a representação do tubo marcado com anticorpo secundário acoplado ao fluoróforo Alexa 488. Em B, a marcação de albumina que mostra que 88,6% da população expressavam a proteína no vigésimo quarto dia da fase de maturação hepática.

Ao fim da última etapa da maturação dos hepatócitos, as células voltaram ao cultivo em monocamada. Esta última dissociação dos agregados celulares, foi mais difícil do que a realizada na etapa inicial e verificamos maior mortalidade mesmo após os ajustes do protocolo, o que resultava em um total de células reduzido no cultivo final. Os melhores resultados foram obtidos com o uso de Colagenase I por 20 minutos, seguido de Tripsina-EDTA 0,25% por cerca de dois minutos. Após a digestão, observamos que as células apresentavam morfologia poligonal preservada e compatível com hepatócitos primários em cultura (Figura 29).

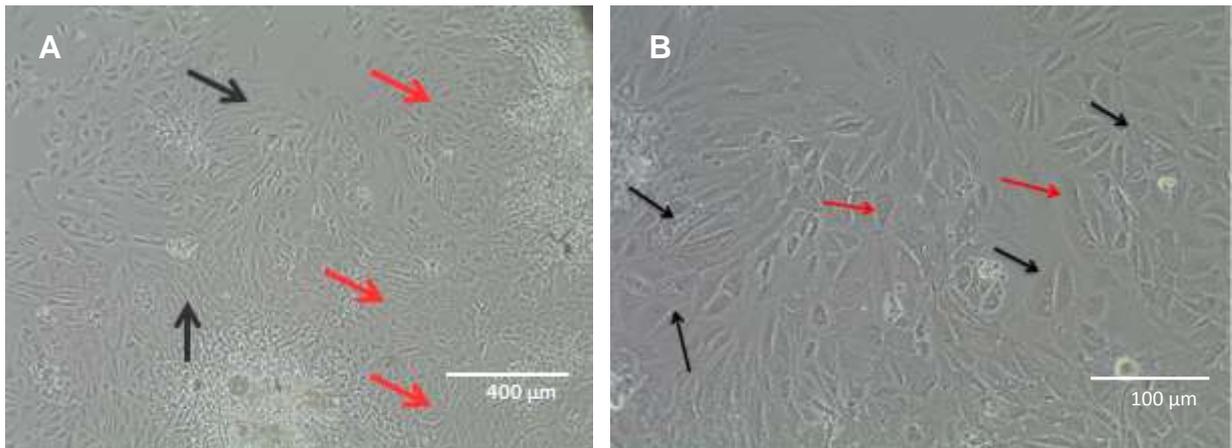


Figura 29: Imagens representativas do quadragésimo terceiro dia de cultivo. Em vermelho estão indicadas as células poligonais com núcleo centralizado. As setas pretas indicam células alongadas com morfologia inesperada pra esta etapa (A). Em maior aumento, estão indicadas em vermelho os hepatócitos-like binucleados e, por setas pretas estão indicadas as células com citoplasma contendo grânulos e vacúolos (B). Imagens adquiridas por microscopia de campo claro. Barras de calibração: A, 400 µm; B, 100 µm.

#### 5.4. Padronização da técnica de citometria de fluxo

Ao longo do protocolo de diferenciação, a imunofenotipagem foi realizada em quatro momentos diferentes (Figura 30). Os dados referentes à citometria de fluxo expressos neste trabalho até o momento foram resultados da padronização do procedimento após os ajustes descritos ao longo deste item.

No terceiro dia do protocolo, para avaliar a formação do endoderma, foram analisadas as expressões de CXCR4, CD117, EpCAM, FOXA2 e SOX17. Nesta etapa, as células estavam em suspensão e organizadas em EBs. A digestão dos EBs foi testada com soluções diferentes para padronização do protocolo. Concluídos os testes, notamos que o melhor resultado com a digestão utilizando Colagenase I por 20 minutos e Tripsina-EDTA 0,25% por cerca de 30 segundos (Figura 31).

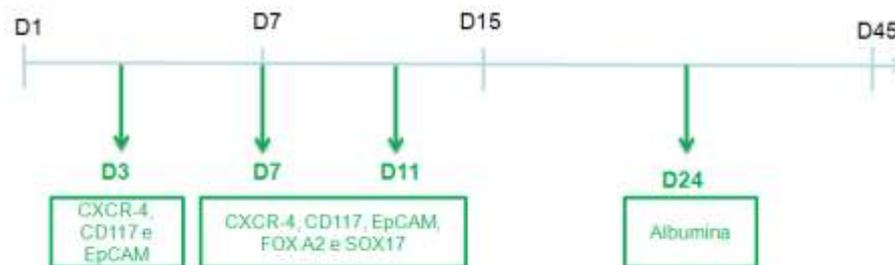


Figura 30: Esquema representativo dos pontos de realização da citometria de fluxo. No terceiro (D3), sétimo (D7) e décimo primeiro (D11) dias, analisamos as moléculas expressas no folheto embrionário endoderma. No vigésimo quarto (D24) dia, avaliamos a expressão de albumina, característica da fase de maturação dos hepatócitos.

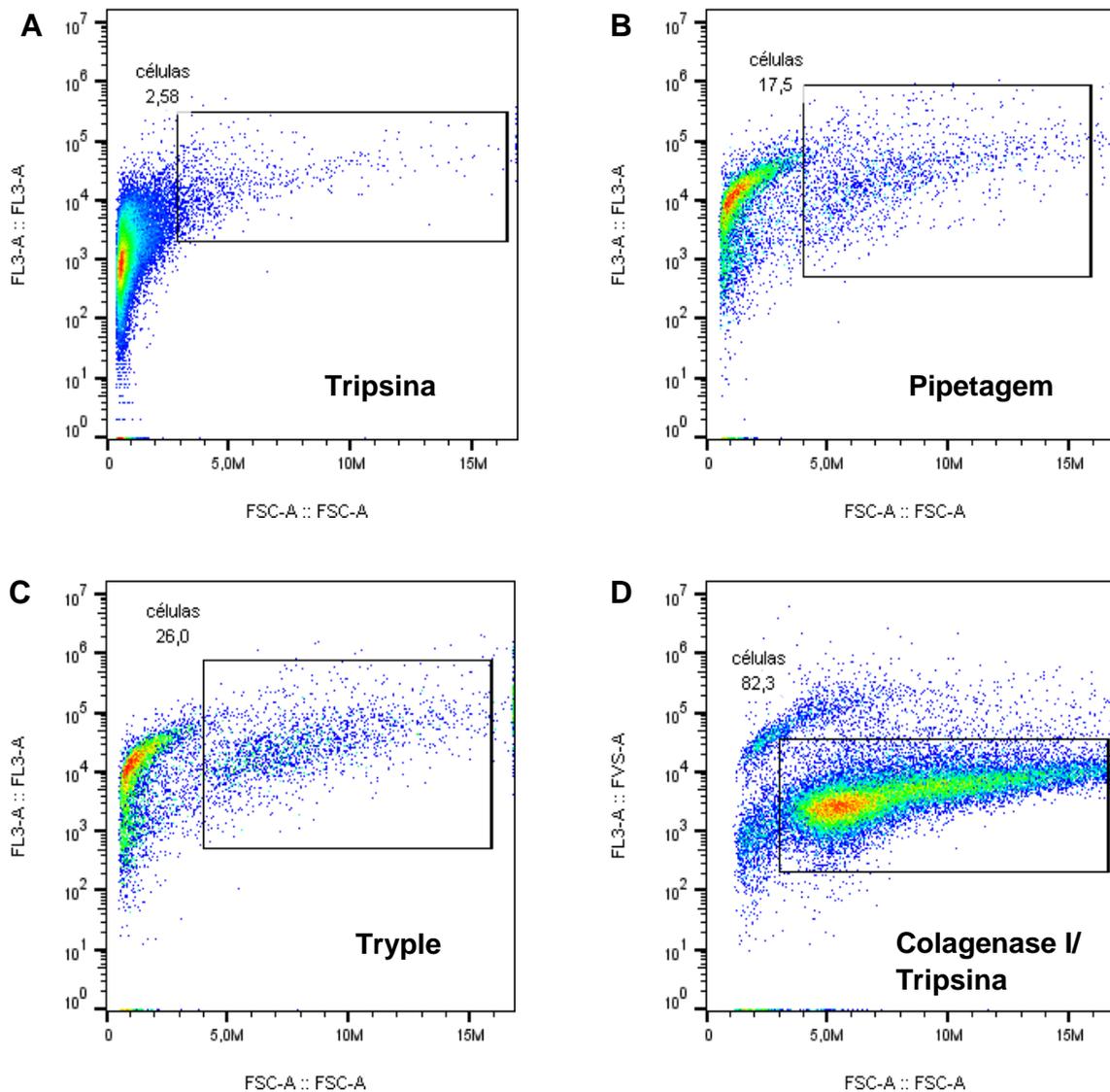


Figura 31: Dotplots representativos de diferentes protocolos utilizados para a dissociação das células. O parâmetro de avaliação foi o percentual de células vivas obtidas em cada um deles. Em A, observamos grande número de células mortas, localizadas rente ao eixo Y devido ao baixo tamanho, e a população de interesse corresponde a 2,58%. Em B, ainda com grande mortalidade. Em C, obtivemos somente 26% de células vivas. Em D, a melhor metodologia com 82,3% de células viáveis. *FSC- forward scatter*; FL3: intensidade de fluorescência no canal 3, neste caso células marcadas com *fixable viable stain* (FVS) para avaliação de viabilidade celular.

Não encontramos diferença relevante nos resultados obtidos entre os diferentes soluções de fixação (Paraformaldeído 1 e 4%) e as soluções de permeabilização (PBS/ Triton 0,1 e 0,3%). Sendo assim, utilizamos Paraformaldeído 4% para fixação e PBS/Triton 0,3% para a permeabilização celular. Após os ajustes na etapa de preparo para a citometria de fluxo, analisamos a expressão das moléculas envolvidas.

### 5.5. Avaliação da produção de albumina por ELISA

No vigésimo quarto dia, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a avaliação da secreção de albumina pela técnica de ELISA. Realizamos curva padrão de albumina conforme o gráfico representado na Figura 32.

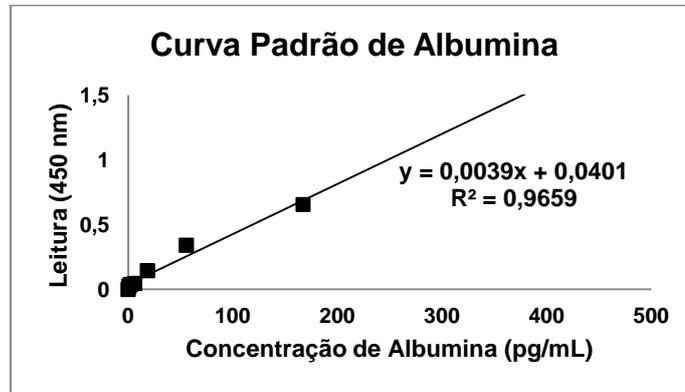


Figura 32: Curva padrão de albumina. Gráfico representativo da curva padrão utilizando a técnica de ELISA com leitura a 450 nm. Estão expressos no gráfico a equação da reta e o valor de R<sup>2</sup>. A equação da reta foi utilizada posteriormente para determinação da concentração de albumina das diferenciações com base nas leituras obtidas nas amostras. O valor de R<sup>2</sup> foi de 96,59%.

Substituindo os valores da equação da reta para encontrar a concentração de albumina dos controles positivo (HepG2) e negativo (HES2), obtivemos os resultados compilados na Tabela 11.

Utilizando o mesmo procedimento para determinar a concentração de albumina nas diferenciações (hep-HES2), obtivemos os valores expressos na Tabela 12.

**Tabela 11: Determinação da concentração de albumina nos controles utilizados no teste de ELISA.**

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)
CONTROLE – (1)	-10,28
CONTROLE – (2)	-12,85
CONTROLE – (3)	-10,54
CONTROLE + (1)	629,97
CONTROLE + (2)	611,77
CONTROLE + (3)	459,21

As numerações de 1 a 3, em cada controle, correspondem ao sobrenadante coletado em três diferentes cultivos das linhagens em condições basais, 24h após a troca de meio. Como controle negativo foi utilizada linhagem embrionária HES2. Com controle positivo foi utilizada a linhagem hepática HepG2.

**Tabela 12: Determinação da concentração de albumina nos hepatócitos gerados (hep-HES2) pela técnica de ELISA.**

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (pg/mL)
hep-HES2 A	503,82
hep-HES2 B	40,49
hep-HES2 C	494,85
hep-HES2 D	119,72
hep-HES2 E	381,51
hep-HES2 F	402,79

A sequência de letras A até F indicam seis diferenciações realizadas durante este trabalho. O sobrenadante foi coletado 24h após a troca de meio das células.

Encontramos diferença estatística entre os dados do controle negativo e aqueles obtidos nas amostras (hep-HES2). Entre os valores encontrados nas diferenciações e o controle positivo não houve diferença estatística, evidenciando que as células hep-HES2 geradas utilizando o protocolo padronizado durante a confecção deste trabalho produzem albumina nos mesmos níveis encontrados em células tumorais hepáticas (Figura 33).

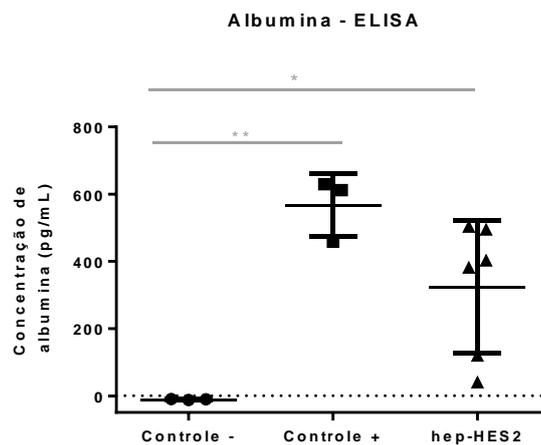


Figura 33: Gráfico da análise estatística da produção de albumina. Como controle negativo utilizamos a linhagem embrionária HES2. Como controle positivo utilizamos a linhagem hepática HepG2. A produção de albumina nos hepatócitos gerados está identificada como hep-HES2. Resultados expressos por média  $\pm$  desvio-padrão. Valor de  $p^{(*)}=0,0311$  e  $(^{**})=0,0032$ .

## 6. Discussão

A diferenciação hepática a partir de células embrionárias foi descrita pela primeira vez em 2003 (RAMBHATLA et al., 2003). O estabelecimento do processo de diferenciação tem se mostrado um grande desafio para a ciência. A ampla gama de funções realizadas pelos hepatócitos envolve complexas sinalizações celulares que precisam ser elucidadas para a obtenção de um bom resultado final.

As estratégias iniciais de diferenciação utilizavam somente a activina A para a indução do endoderma. Os resultados mostravam baixa eficiência e uma população mista ao fim do processo. A descoberta do papel de diversas citocinas no desenvolvimento embrionário associada a técnicas de cultivo tridimensional resultaram em maior eficiência e reprodutibilidade na geração de hepatócitos (GOUON-EVANS et al., 2006; MIKI; RING; GERLACH, 2011; BROWN et al., 2011; WANG et al., 2015).

Motivados pelos resultados descritos na literatura científica e diante do desafio em estabelecer um cultivo a longo de prazo de hepatócitos humanos, propusemos, neste trabalho, estabelecer e padronizar um protocolo de diferenciação celular que pudesse gerar hepatócitos a partir de CTEs humanas.

Optamos por estabelecer o processo em CTEs, pois os resultados descritos na literatura para as linhagens são robustos. As CTEs representam plataformas de estudo fidedignas do desenvolvimento embrionário humano (ZHOU et al., 2012).

O protocolo escolhido para a diferenciação da linhagem HES2 foi baseado no descrito por Ogawa e colaboradores (2013) onde encontramos a compilação de técnicas utilizadas com resultados comprovados por diferentes artigos publicados e aperfeiçoamento de algumas etapas que representaram grande desafio para outros grupos de pesquisa, como a maturação dos hepatócitos (CAI et al., 2007; SI-TAYEB et al., 2010; SULLIVAN et al., 2010). Além disso, os meios de cultura utilizados não utilizam SFB, o que aumenta a reprodutibilidade da técnica. Agregado a isso, o protocolo citado foi passível de reprodução em diferentes linhagens de CTEs e de células-tronco de pluripotência induzida (OGAWA et al., 2013).

Apesar de já descrito por alguns grupos, o protocolo de obtenção de hepatócitos em cultivo continua sendo um desafio e não tinha sido estabelecido previamente no IIBCCF. As adaptações feitas ao longo do processo foram baseadas nas experiências do nosso grupo com outros tipos celulares e em pesquisas bibliográficas.

Estudos prévios demonstraram que a indução do endoderma em cultivo tridimensional produziu maior número de células se comparada ao processo realizado em monocamada (MFOPOU et al., 2010). Os ajustes realizados na etapa de agregação celular foram determinantes para o sucesso do protocolo. O tempo e a solução padronizados determinaram a formação de EBs com bordas bem delimitadas, morfologia alinhada à descrita por diversos grupos (GOUON-EVANS et al., 2006; MIKI; RING; GERLACH, 2011; OGAWA et al., 2013).

A importância da via activina/nodal para a formação do endoderma é bem descrita na literatura (GREEN et al., 2011; NOSTRO et al., 2011). A ampliação da janela temporal da ativação da via, de cinco para seis dias, permitiu que obtivéssemos valores na expressão de marcadores de endoderma correspondentes aos descritos na literatura, o que significa que neste trabalho o endoderma só estava completamente formado no sétimo dia, nos permitindo a partir deste resultado, seguir para as etapas subsequentes e obtermos hepatócitos (Hep-HES2).

Ao término da indução do endoderma, os agregados celulares foram digeridos com diferentes soluções. A solução enzimática Tryple, uma enzima recombinante de ação mais branda de acordo com o fabricante, não proporcionou digestão eficiente dos EBs. A solução de Tripsina-EDTA 0,25% promoveu dissociação excessiva, inviabilizando o cultivo. Os melhores resultados foram obtidos com o uso das enzimas Colagenase I, seguido por rápida dissociação com Tripsina-EDTA 0,25%.

A geração eficiente do endoderma é determinante para uma diferenciação hepática eficiente (HOLTZINGER et al., 2015). No entanto, diferentes grupos relatam dados conflituosos nos parâmetros de definição de endoderma. Apesar de ainda não haver um marcador específico de endoderma, há consenso na literatura que a expressão de CXCR4, CD117, EpCAM, FOXA2 e SOX17 são indicativos da presença deste folheto embrionário (GREEN et al., 2011; LOH et al., 2014; WANG et al., 2015; HOLTZINGER et al., 2015; KANG et al, 2017).

HOLTZINGER e colaboradores consideram o CXCR4 o principal marcador da formação do endoderma (HOLTZINGER et al., 2015). Diversos grupos avaliam que a expressão de CXCR4 em 90% das células em cultivo é suficiente para confirmar a geração do endoderma (LOH et al, 2014; WANG et al, 2015). Estes dados estão em consonância com os que encontramos em nosso protocolo, que teve a média de 89,5% de células com este perfil imunofenotípico, confirmando a indução do endoderma no sétimo dia do protocolo.

JAAFARPOUR e colaboradores consideraram que o aumento na expressão de CXCR4, FOXA2 e SOX17 confirmava a formação do endoderma quando expressos em 70% da população celular, o que está de acordo com os nossos resultados (JAAFARPOUR et al., 2016).

GREEN e colaboradores também demonstraram que há grande aumento na expressão de FOXA2 entre o primeiro e o sexto dia, durante a fase de indução do endoderma (GREEN et al., 2011). O fator de transcrição FOXA2 atua principalmente nessa etapa inicial do desenvolvimento e no início da especificação hepática. A molécula FOXA2 continua a ser expressa mesmo nas fases mais tardias da diferenciação apesar de sua função nas etapas posteriores à formação do endoderma não serem bem descritas (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015).

Encontramos média de 67% de células SOX17 positivas no sétimo dia de cultivo, o que vai de encontro com os dados obtidos por NOSTRO e colaboradores para comprovação da formação do endoderma definitivo. Esta molécula está presente nos progenitores hepato-pancreáticos encontrados ao término da formação do endoderma definitivo. WANG e colaboradores compararam diferentes protocolos e consideraram que a expressão de SOX17 por 70% da população era suficiente para garantir que a etapa de geração do endoderma fora um sucesso (NOSTRO et al., 2011; WANG et al., 2015).

Em relação à morfologia, ao término da geração do endoderma, observamos que as células não se organizavam mais em colônias e passavam de completamente arredondadas para uma morfologia poligonal. Esses dados estão em consonância com os relatados em diversos artigos (TAKAYAMA et al., 2012; KIM et al., 2017; RAJU et al., 2017).

Ao longo do processo de especificação hepática, mediado por sinalização via BMP4 e FGF-10, as células passaram a apresentar morfologia poligonal, grande número de vacúolos e citoplasmas granulosos conforme relatos de diversos grupos corroborando a geração de hepatoblastos (GOUON-EVANS et al., 2006; CAI et al., 2007; TAKAYAMA et al., 2012; FUKUDA et al., 2017; RAJU et al., 2017).

A fase final do processo de diferenciação - a maturação - com a expressão de genes envolvidos na detoxificação de substâncias, ainda se impõe como barreira para a geração de hepatócitos. A biologia celular desta etapa ainda não é bem elucidada, o que impacta diretamente na nossa capacidade de reproduzi-la *in vitro*. (TOUBOUL et al., 2016)

A primeira etapa de maturação dos hepatócitos, que ocorreu entre o décimo quinto e vigésimo sexto dia, teve como resultado final a produção de albumina pelos hepatócitos gerados. A expressão de albumina foi verificada por citometria de fluxo e a secreção por ELISA. Em todas as diferenciações realizadas observamos a produção de albumina, confirmando a geração de hep-HES2 pelo nosso grupo.

A segunda etapa de maturação foi realizada em cultivo tridimensional com base em estudos prévios que comprovaram que as enzimas do complexo P450, envolvidas nos processos de detoxificação, foram encontradas em maior quantidade após esta técnica (MIKI; RING; GERLACH, 2011; SIVERTSSON et al., 2013; TAKAYAMA et al., 2013).

Ao término da maturação, submetemos as células a cultivo em monocamada novamente e a morfologia poligonal foi mantida, havendo entre elas algumas células binucleadas, o que vai de encontro com o descrito por KIM e colaboradores (KIM et al., 2017). Algumas células apresentaram morfologia mais alongada que o esperado para esta etapa. A desagregação que precede o cultivo tridimensional representou um grande desafio ao nosso protocolo, o que influenciou o baixo número de células ao final do protocolo. Este foi um impeditivo para a realização de algumas técnicas desejadas como imunofluorescência para albumina e RT-PCR para expressão de enzimas do complexo P450.

O reduzido número de células geradas é o maior problema descrito por todos os grupos envolvidos com diferenciação hepática e corresponde ao maior desafio da técnica (GOUON-EVANS et al., 2006; NOSTRO et al., 2011; CARPENTIER et al., 2016; FUKUDA et al., 2017; RAJU et al., 2017). Estes grupos também destacaram o prolongado tempo do protocolo, o que aumenta a probabilidade de contaminações, e o custo como questões a serem aprimoradas. Nosso grupo também se preocupou em avaliar os custos do protocolo conforme como pode ser visto nos Anexos I e II. E ressaltamos que além dos valores, devem ser levados em consideração os objetivos do estudo, uma vez que hepatocarcinomas não podem ser utilizados para triagem de fármacos apesar de representarem o menor custo.

Visando superar o reduzido número de células ao longo da diferenciação hepática recentes estudos têm incluído novas etapas e quimiocinas ao processo. RAJU e colaboradores adicionaram uma etapa de expansão celular sobre MEF logo após a formação do endoderma. O grupo realizou duas passagens celulares em meio contendo FGF2 (10 ng/ml) and BMP4 (50 ng/mL) antes do início da etapa de

especificação hepática. Porém, o aumento na produção foi menor que o esperado e o grupo notou maior heterogeneidade no cultivo após as passagens, com aumento da presença de células com morfologia fibroblastoide (RAJU et al., 2017).

FUKUDA e colaboradores utilizaram SB431542 (inibidor de receptores de TGF- $\beta$ ) e Y27632 (inibidor da via Rho quinase) e obtiveram maior eficiência na geração de hepatócitos imaturos, evidenciada pela expressão de albumina. A inibição da sinalização TGF- $\beta$  demonstrou-se importante para evitar a diferenciação em colangiócitos e o inibidor da via Rho quinase, também utilizado em nossos experimentos, aumenta a viabilidade celular (FUKUDA et al., 2017).

Devido às dificuldades na etapa final de maturação, acreditamos que melhores resultados serão obtidos com o cultivo em monocamada, o que deve reduzir a perda de células com os tratamentos enzimáticos ao longo do protocolo.

Outro aspecto relevante deste trabalho é a redução do uso de animais na pesquisa científica. Além disso, a geração de hepatócitos a partir de células-tronco pluripotentes permite que, no futuro, estas células sejam utilizadas em testes farmacológicos. Isso acrescentaria uma etapa prévia à experimentação animal, objetivando uma triagem e eliminando drogas com toxicidade comprovada nos hepatócitos *in vitro*. No mais, os atuais testes farmacológicos não apresentam desempenho exemplar no que tange a avaliação da hepatotoxicidade, já que esta é a maior causa de retirada de medicamentos no mercado mundial (RASCHI et al., 2014).

Em suma, acreditamos que o protocolo desenvolvido ao longo deste trabalho contribui para a futura utilização dos hepatócitos derivados de células embrionárias humanas em plataformas de testes de fármacos e na recelularização de matrizes hepáticas.

## **7. Conclusão**

Concluimos que nosso protocolo de geração hepatócitos a partir de células embrionárias foi realizado com alta eficiência, tomando como base a produção de albumina, e estabelecido com sucesso.

A geração do endoderma - confirmada pela expressão de CXCR4, CD117, EpCAM, FOXA2 e SOX17 - obteve resultados em concordância com os descritos na literatura. As células apresentaram características morfológicas correspondentes àquelas descritas para as respectivas fases do processo de diferenciação.

Ao final do protocolo, os hepatócitos expressavam e produziam albumina, o que foi comprovado pelas técnicas de citometria de fluxo e ELISA.

## 8. Referências Bibliográficas

ATCC. Banco de Células. Disponível em: <https://www.atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>. Acesso em: 05 julho. 2017.

BARRETT, P.N. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a Vero-cell-culture-derived trivalent influenza vaccine: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9767, p. 751-759. 2011.

BOCHKIS, I.M. et al. Genome-wide location analysis reveals distinct transcriptional circuitry by paralogous regulators Foxa1 and Foxa2. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002770. 2012.

BRIVANLOU, A.H. et al. Setting standards for human embryonic stem cells. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 913-916. 2003.

BROWN, S. et al. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. **Stem Cells**, v. 29, n. 8, p. 1176-1185. 2011.

BRASIL. Lei nº 11.105, de março de 2005. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 mar. 2005. Seção 1, p. 1.

CARPENTIER, A. et al. Hepatic differentiation of human pluripotent stem cells in miniaturized format suitable for high-throughput screen. **Stem Cell Res**, v. 16, n. 3, p. 640–650. 2016.

CAI, J. et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1229-1239. 2007.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 15, n.5, p. 516-528. 1912.

CHOI, J. et al. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1173-1181. 2015.

COWAN, C.A. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 13, p. 1353-1356. 2004.

D'AMOUR, K.A. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1534-1541. 2005.

DREXLER, H.G.; UPHOFF, C.C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75-90. 2002.

DU, Y. et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 394-403. 2014.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 99, n. 2, p. 167-182. 1954.

DUNCAN, T.; VALENZUELA, M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 111. 2017.

DUVAL, K. et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277. 2017.

ENDERS, J. F.; WELLER T.H.; ROBBINS F.C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. **Science (Washington)**, p. 85-87. 1949.

EVANS, M.J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156. 1981.

FELL, H. B. Tissue culture and its contribution to biology and medicine. **Journal of Experimental Biology**, v. 57, n. 1, p. 1-13. 1972.

FRAGA, A. M. et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 431-440. 2011.

FRESHNEY, R. I. (2006) Basic Principles of Cell Culture, In: **Culture of Cells for Tissue Engineering**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006. cap. 1, p3-22.

FRESHNEY, R.I. Application of cell cultures to toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, n. 4, p. 213-230. 2001.

FUKUDA, T. et al. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. **Experimental Cell Research**, v. 352, n. 2, p. 333-345. 2017.

GÉRARD, C.; TYS, J.; LEMAIGRE, F.P. Gene regulatory networks in differentiation and direct reprogramming of hepatic cells. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2016.

GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development. **Development**, v. 142, n. 12, p. 2094-2108. 2015.

GOUON-EVANS, V. et al. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1402-1411. 2006.

GOVORKOVA, E.A. et al. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5519-5524. 1996.

GREEN, M.D. et al. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 267-272. 2011.

GUO, X.; WANG, X.F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. **Cell Res**, v. 19, n. 1, p. 71-88. 2009.

- GUO, L. et al. Similarities and differences in the expression of drug metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 3, p. 528-538. 2011.
- HAMBURGER, V. Wilhelm Roux: Visionary with a Blind Spot VIKTOR. **Journal of the History of Biology**, v. 30, n. 2, p. 229–238. 1997.
- HARRISON, R.G. et al. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p. 116-128. 1907.
- HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614-636. 1965.
- HENRY, G. L.; MELTON, D. A. Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. **Science**, v. 281, p. 91-96. 1998.
- HITOSHI, S. et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. **Genes & Development**, v. 16, n. 7, p. 846-858. 2002.
- HOLDITCH, S.J.; TERZIC, A.; IKEDA, Y. Concise Review: Pluripotent Stem Cell-Based Regenerative Applications for Failing  $\beta$ -Cell Function. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 3, n. 5, p. 653-661. 2014.
- HOLTZINGER, A. et al. New markers for tracking endoderm induction and hepatocyte differentiation from human pluripotent stem cells. **Development**, v. 142, n. 24, p. 4253-4265. 2015.
- HOLTZINGER, A. et al. New markers for tracking endoderm induction and hepatocyte differentiation from human pluripotent stem cells. **Development**, v. 142, n. 24, p. 4253-4265. 2015.
- HUANG, P. et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 386-389. 2011.
- JAAFARPOUR, Z. et al. Differentiation of definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells on hMSCs feeder in a defined medium. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 2. 2016.
- KAMIYA, A. et al. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. **The EMBO Journal**, v. 18, n.8, p. 2127-2136. 1999.
- KANG, S. et al. Hepatic population derived from human pluripotent stem cells is effectively increased by selective removal of undifferentiated stem cells using YM155. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 78. 2017.
- KAWASAKI, H. et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell–derived inducing activity. **Neuron**, v. 28, n. 1, p. 31-40. 2000.
- KIM, J. et al. Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15706. 2015.

- KIM, K. et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 285-290. 2010.
- KIM, J.H. et al. Prediction of hepatotoxicity for drugs using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. **Cell Biology and Toxicology**, p. 1-14. 2017.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497. 1975.
- KUBO, A. et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. **Development**, v. 131, p. 1651–1662. 2004.
- KUMAR, A. et al. Nodal signaling uses activin and transforming growth factor-beta receptor-regulated Smads. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 656-61. 2001.
- LAFLAMME, M.A. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1015-1024. 2007.
- LOH, K.M. et al. Efficient endoderm induction from human pluripotent stem cells by logically directing signals controlling lineage bifurcations. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 2, p. 237-252. 2014.
- MA, H. et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. 177-183. 2014.
- MANDAL, P.K.; BLANPAIN, C.; ROSSI, D.J. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 198-202. 2011.
- MASSAGUE, J.; WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 8, p. 1745-54. 2000.
- MASTERS, J.R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 315-319. 2002.
- MCLIN, V.A.; RANKIN, S.A.; ZORN, A.M. Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2207-2217. 2007.
- MFOPOU, J.K. et al. Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells. **Gastroenterology**, v. 138, n. 7, p. 2233-2245. 2010.
- MIKI, T.; RING, A.; GERLACH, J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n.5, p. 557-568. 2011.
- MURRY, C.E.; KELLER, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 661-680. 2008.

- NOSTRO, M. C. et al. Stage-specific signaling through TGF $\beta$  family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. **Development**, v. 138, n. 5, p. 861-871. 2011.
- ODOM, D.T. et al. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. **Nature genetics**, v. 39, n. 6, p. 730-732. 2007.
- OGAWA, S. et al. Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. **Development**, v. 140, n.15, p. 3285-3296. 2013.
- PARK, C. et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1-and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. **Development**, v. 131, n. 11, p. 2749-2762. 2004.
- PARLAMENTO EUROPEU. Directive 2003/15/EC of the european parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Union**. Fev. 2003.
- PASSIER, R. et al. Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum-free cultures. **Stem Cells**, v. 23, n. 6, p. 772-780. 2005.
- PEREIRA, L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & saúde coletiva**, v.13, n. 1, p. 7-14. 2008.
- RAMBHATLA, L. et al. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. **Cell transplantation**, v. 12, n. 1, p. 1-11. 2003.
- RAJU, R. et al. Cell Expansion During Directed Differentiation of Stem Cells Toward the Hepatic Lineage. **Stem cells and development**, v. 26, n. 4, p. 274-284. 2017.
- RASCHI, E. et al. Assessing liver injury associated with antimycotics: Concise literature review and clues from data mining of the FAERS database. **World J Hepatol**, v. 6, n. 8, p. 601-12. 2014.
- RASHID, S.T. et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 9, p. 3127. 2010.
- REUBINOFF, B.E. et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 399-404. 2000.
- ROSSI, J.M. et al. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. **Genes & development**, v. 15, n. 15, p. 1998-2009. 2001.
- SANTO, V.E. et al. Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs. **Biotechnology journal**, v. 12, n. 1. 2017.
- SEKIYA, S.; SUZUKI, A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 390-393. 2011.

SI-TAYEB, K.; LEMAIGRE, F.P.; DUNCAN, S.A. Organogenesis and development of the liver. **Developmental cell**, v. 18, n. 2, p. 175-189. 2010.

SI-TAYEB, K. et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. **Hepatology**, v. 51, p. 297-305. 2010.

SIVERTSSON, L. et al. Hepatic differentiation and maturation of human embryonic stem cells cultured in a perfused three-dimensional bioreactor. **Stem Cells and Development**, v. 22, n.4, p. 581-594. 2013.

SLADEK, F. M. et al. Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p.6509–6522. 1999.

SULLIVAN, G. J. et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. **Hepatology**, v. 51, p. 329-335. 2010.

SUZUKI, A. et al. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. **Development**, v. 130, n. 11, p. 2513-2524. 2003.

TAKAHASHI, T. et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. **Circulation**, v. 107, n. 14, p. 1912-1916. 2003.

TAKAYAMA, K. et al. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. **Molecular Therapy**, v. 20, n. 1, p. 127-137. 2012.

TAKAYAMA, K. et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1781-1789. 2013.

TANG, Z. et al. Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. **Journal of translational medicine**, v. 15, n. 1, p. 99. 2017.

THOMSON J. A. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 7844-7848. 1995.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147. 1998.

TOUBOUL, T. et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. **Hepatology**, v. 51, n. 5, p. 1754-1765. 2010.

TOUBOUL, T. et al. Stage-specific regulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 6, p. 1315-1326. 2016.

VIG, K. et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 789. 2017.

- VITALE, I. et al. DNA Damage in Stem Cells. **Molecular Cell**, v. 66, n. 3, p. 306-319. 2017.
- WANG, Z. et al. Activin A can induce definitive endoderm differentiation from human parthenogenetic embryonic stem cells. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 8, p. 1711, 2015.
- WANG, H. et al. Improvement of cell survival during human pluripotent stem cell definitive endoderm differentiation. **Stem cells and development**, v. 24, n. 21, p. 2536-2546. 2015.
- WAUTHIER, E. et al. Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. **Methods in cell biology**, v. 86, p. 137-225. 2008.
- WILLEMSE, J. et al. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. **Best Pract Res Clinl Gastroenterol**, v. 31, n. 2, p. 151-159. 2017.
- WESTERINK, W.M.A.; SCHOONEN, W.G.E.J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1581-1591. 2007.
- WOLL, P.S. et al. Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 122-131. 2008.
- WU, Wi; JIN, Y; GAO, Z. Directly reprogramming fibroblasts into adipogenic, neurogenic and hepatogenic differentiation lineages by defined factors. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 6, p. 2685-2690. 2017.
- XU, C. et al. Chromatin “prepattern” and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas. **Science**, v. 332, n. 6032, p. 963-966. 2011.
- XU, C. et al. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Circulation research**, v. 91, n. 6, p. 501-508. 2002.
- YU, B. et al. Reprogramming Fibroblasts into Bipotential Hepatic Stem Cells by Defined Factors. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 33, p. 328-340. 2013.
- ZHOU, W. et al. Stem cell differentiation and human liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 17, p. 2018. 2012.

### ANEXO I – Avaliação dos custos do projeto

<b>Meio MEF</b>	
Uso estimado do meio MEF/ diferenciação (mL)	20
Custo (R\$)	16,40

<b>Meio de cultivo basal para HES2</b>	
Cultivo da HES2 por 10 dias	
Uso estimado do meio/ diferenciação (mL)	100
Custo (R\$)	101,82

<b>Geração de hepatócitos*</b>	
Meio de agregação	231,83
Meio de indução do endoderma I (D2 ao D4)	228,49
Meio de indução do endoderma II (D4 ao D7)	336,36
Meio de especificação hepática I (D7 ao D9)	66,49
Meio de especificação hepática II (D9 ao D11)	97,25
Meio de geração de hepatoblastos (D11 ao D15)	133,53
Meio de maturação I (D15 ao D27)	649,77
Meio de maturação II (D27 ao D33)	570,74
Hepatozyme®	102,00
Total por diferenciação (R\$)	2416,47

\*Custo calculado a partir de 10 milhões da linhagem HES2 (1 placa de 100 mm<sup>2</sup>) gerando 6 milhões de hepatócitos (1 placa de 12 poços) ao final da maturação.

<b>Material de Apoio**</b>	
Total por diferenciação (R\$)	82,16

\*\*Trypsina-EDTA 0,25%,  
Colagenase I, PBS e  
DMSO.

<b>Anticorpos para citometria de fluxo</b>	
Total por diferenciação (R\$)	40,13

<b>Kit para ELISA</b>	
R\$ 112,88	

<b>Importação da HES2</b>	
Total (R\$)	9081,84

<b>Profissional Técnico – Nível Superior</b>	R\$ 3000,00/ mês
--	---------------------

<b>Custo Total</b>	
Insumos por diferenciação (R\$)	2416,47
Importação da HES2 (R\$)	9081,84
Profissional Técnico (R\$)	R\$ 3000,00/ mês

## ANEXO II – Avaliação de custos do uso de hepatócitos primários e linhagem de hepatocarcinoma

<b>Custos da HepG2 (R\$)</b>	1625,00
Fornecedor nacional.	

<b>Hepatócitos Primários</b>			
<b>Fornecedor</b>	<b>Custo da célula (R\$)*</b>	<b>Importação (R\$)</b>	<b>Total (R\$)</b>
Xenotech	3046,24	3950,00	6996,24
Zen-bio	748,92	3950,00	4698,92
Science Cells	2038,2	3950,00	5988,20

\*Preço de 1 vial com cerca de 1 milhão de células. As células não podem ser expandidas e devem ser cultivadas em meios específicos com preços em torno de R\$1200,00.

<b>Sites (Consultados em 27.07.2017)</b>
<a href="https://www.xenotech.com/products/hepatocytes/human/geneknown-hepatocytes">https://www.xenotech.com/products/hepatocytes/human/geneknown-hepatocytes</a>
<a href="http://www.zen-bio.com/products/cells/hepatocytes.php">http://www.zen-bio.com/products/cells/hepatocytes.php</a>
<a href="https://www.sciencellonline.com/products-services/primary-cells/human-hepatocytes-105.html">https://www.sciencellonline.com/products-services/primary-cells/human-hepatocytes-105.html</a>