



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA-UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ARTHUR CÁSSIO DE LIMA LUNA

AÇÃO DA PROGRANULINA E HNF4-ALFA NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM *RATTUS*
NORVEGICUS

Areia-PB

2012

ARTHUR CÁSSIO DE LIMA LUNA

AÇÃO DA PROGRANULINA E HNF4-ALFA NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM *RATTUS*
NORVEGICUS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal da
Paraíba como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Areia-PB

2012

ARTHUR CÁSSIO DE LIMA LUNA

AÇÃO DA PROGRANULINA E HNF4-ALFA NA PROLIFERAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM *RATTUS*
NORVEGICUS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal da
Paraíba como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Aprovado em 04 de Dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Orientador-DCV/CCA/UFPB

Prof^a. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez

Examinadora-DZ/CCA/UFPB

Prof^a. Dr^a Katerin Elena Bohorquez Grondona

Examinadora- DCV/CCA/UFPB

Dedicatória

Aos meus pais, Marcos Lima e Norma Luna, “*noor dos meus olhos*”.

Dedicando-a tento compensar-vos um pouco das horas que me afastei do vosso convívio absorvido neste trabalho.

Agradecimentos

A DEUS, por arquitetar a vida em ampla complexidade, tal qual distende o entendimento finito humano;

Aos meus pais, toda minha gratidão pelo incentivo durante a jornada acadêmica, e ainda pelos ensinamentos, senso comum, que me fizeram ser mais humano, mais leal aos meus objetivos e anseios. Assim como, estendo a minha irmã e meu irmão, Tamires Luna e Lucas Luna, pelas conversas produtivas e companheirismo;

Aos meus familiares, em particular às minhas avós, Iracir Lima e Anizia Luna, que são exemplos de superação e dedicação familiar;

Ao meu tio Francisco Luna, por sempre estimular o meu interesse pela leitura, e corroborar para o desenvolvimento deste trabalho, mesmo que indiretamente;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo, eu agradeço por me ingressar no universo científico, fornecendo-me conhecimento e base profissional. Ainda, por compartilhar comigo o seu tema de pesquisa. Obrigado pela confiança concedida enquanto estive sob sua orientação, sou grato pelos ensinamentos e contribuições durante a execução deste trabalho;

A Prof^a. Dr^a. Maria Angélica, por disponibilizar o seu laboratório na Faculdade de Medicina Veterinária da USP, para a realização de parte primordial deste trabalho;

Deixo também meus agradecimentos à Coordenação de Biologia, em especial ao Prof. Dr. Reinaldo e a Secretária Delza, pela dedicação e pelo empenho, com os quais, conduzem a Coordenação;

Aos colegas de laboratório: Raul Antunes, Millena Oliveira e Severino Netto, pelo companheirismo e pela ajuda na construção do conhecimento e enriquecimento científico durante esses anos de graduação;

Aos meus amigos: Tamires Kelly, Carlos Frederico (Frederico Evandro), Lucas Costa, Diego Batista (Baiano), Marina Montenegro e Lidiane Ribeiro, por ter tido a oportunidade de conviver e dividir alegria, devaneios e anseios. Fatos esses que me levam a concluir que *posso não ter muitos amigos, mas tenho os melhores*;

A Valéria Câmara, por ser uma pessoa maravilhosa, com quem, compartilhei bons momentos da minha vida;

A Amanda Olivotti e Marcos Vinícius, pelo companheirismo e suporte enquanto estive no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da USP.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e financiamento do projeto.

“AS RETICÊNCIAS SÃO OS TRÊS PRIMEIROS
PASSOS DO PENSAMENTO QUE CONTINUA
POR CONTA PRÓPRIA O SEU CAMINHO”

(MÁRIO QUINTANA)

...

Sumário

Manuscrito 1: AÇÃO DA PROGRANULINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO EM RATOS *F344*

Introdução	12
Material e Métodos	14
Fixação, inclusão e processamento histológico	14
Detecção dos antígenos PGRN, HNF4-alfa e PCNA	15
Resultados	16
Imuno-histoquímica para marcação da PGRN	16
Imuno-histoquímica para marcação do HNF4-alfa	16
Imuno-histoquímica para marcação do PCNA	16
Discussão	16
Agradecimentos	19
Referências	19
Legendas de figuras	24
Figura 1	25
Figura 2	26
Figura 3	27

Manuscrito 2: CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO EM DIFERENTES ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS EM RATOS

Introdução	31
Material e Métodos	32
Animais.....	32
Acasalamentos e obtenção dos embriões	32

Processamento das amostras.....	33
Colorações histológicas	33
Resultados	33
Discussão	34
Referências	36
Agradecimentos	38
Legendas de Figuras	39
Figura 1	40
Figura 2	41

Manuscrito 1

AÇÃO DA PROGRANULINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO EM RATOS *F344*

Resumo

O transplante é a única terapia efetiva para o tratamento de doenças hepáticas em estágio avançado, como a cirrose. A terapia utilizando células-tronco do broto hepático poderia ser uma alternativa de tratamento, uma vez que essas células têm maior potencial de proliferação e diferenciação em hepatócitos adultos. Dessa forma, o desafio é identificar métodos que promovam sua diferenciação em linhagens adultas específicas e funcionais. O presente trabalho visou avaliar a ação do fator de crescimento progranulina (PGRN) e HNF4-alfa durante o desenvolvimento hepático em ratos *F344*, assim como, comparar os seus picos de positividade com o do PCNA. Cinco embriões de cada período embrionário (E12,5; E13,5; E14,5; E15,5 e E16,5) foram coletados, fixados em Metacarn e incluídos em paraplast. Posteriormente, foi realizado o procedimento de imuno-histoquímica, utilizando o anti-PGRN, anti-HNF4-alfa e anti-PCNA, seguindo o protocolo padrão para o procedimento. O anti-PGRN foi positivo em todas as fases observadas, entretanto, em E12,5 e 15,5 demonstrou menor positividade. O anti-HNF4-alfa apresentou maior positividade durante os períodos de E12,5-E14,5, apresentando o seu pico em sincronia com a PGRN (E13,5). O anti-PCNA teve seu pico de positividade em E12,5 e menor positividade em E13,5. Conclui-se que a PGRN está presente na hepatogênese em diferentes estágios embrionários de ratos *F344*, e que a mesma parece estar envolvida no processo de diferenciação de hepatoblastos em hepatócitos após sua ativação pelo HNF4-alfa, no entanto, a PGRN não parece assumir uma função de proliferação celular durante a hepatogênese, pois não apresenta seu pico de positividade em sincronia com o PCNA.

Palavras-Chave: Broto hepático, células-tronco embrionárias, fígado, HNF4-alfa, progranulina.

Abstract

The transplant is the only effective therapy for the treatment of liver diseases in advanced stage, such as cirrhosis. Bridge transplant with stem cells from hepatic bud could be an alternative of treatment, once these cells have greater potential of proliferation and differentiation in adult hepatocytes. Thus, the challenge is to identify methods that promote their differentiation in adult specific and functional strains. The present work aimed to evaluate the action of the growth factor progranulin (PGRN) and HNF4-alpha during the liver development of rats *F344*, as well as, compare the peaks of positivity to those of the PCNA. Five embryos from each embryonic period (E12.5; E13.5; E14.5; E15.5, and E16.5) were collected, fixed in Metacarn and included in paraplast. Posteriorly, it was carried out immunohistochemistry with anti-PGRN, anti- HNF4-alpha and anti-PCNA, following the standard protocols procedure. The anti-PGRN was positive in all stages observed, however, in E12.5 and 15.5 demonstrated a lower positivity. The anti-HNF4-alpha showed high positivity during stages E12.5-E14.5, presenting its peak of positivity in synchrony with that of the PGRN (E13.5). The anti-PCNA had its peak of positivity in E12.5 and less positive in E13.5. It can be concluded that PGRN is present in hepatogenesis in different embryonic stages of *F344* rats, and that it seems to be involved in the differentiation of hepatoblast into hepatocytes after activation by HNF4-alpha, however, PGRN does not seem to assume a function of cell proliferation during hepatogenesis, because its peak of positivity is out of synchrony with that of the PCNA.

Keyword: Hepatic bud, embryonic stem cells, liver, HNF4-alpha, progranulin.

Introdução

Doenças envolvendo órgãos endodermicamente derivados, particularmente pulmões, fígado e pâncreas, incluindo fibrose cística, hepatite crônica e diabetes, respectivamente, afetam milhares de pessoas no mundo. Particularmente, no fígado, ainda que sejam atribuídas propriedades regenerativas, a maioria das lesões ocorrentes são extremamente prejudiciais, podendo ocasionar lesões progressivas neste órgão, e cirrose em casos mais severos (Alfieri & Mies, 2001). Dessa forma, os mecanismos de reparação tornam-se ineficazes, sendo o transplante hepático a única opção. Entretanto, a quantidade insuficiente de doadores de órgãos e a complexidade do procedimento cirúrgico são, ainda nos dias atuais, fatores normalmente limitantes para esta via de tratamento. Uma via alternativa de tratamento para esses pacientes é estimular a regeneração do tecido atingido *in vivo* ou gerar tecido de substituição *in vitro*. Essa área da pesquisa é referida como Medicina Regenerativa (Spence & Wells, 2007).

O uso de hepatócitos primários derivados de um número reduzido de células de fígado adulto, para cultivo celular, poderia ser utilizado como uma solução para o número limitado de doadores humanos. No entanto, observa-se que estas linhagens de células não possuem grande capacidade de proliferação *in vitro*. Contudo, este fator limitante não é verificado em células-tronco embrionárias, as quais mantêm seu potencial de diferenciação para diversos tipos celulares e conseqüentemente as torna fonte importante para diversos tipos celulares e para a terapia celular (Park & Lee, 2005). Outra fonte importante são as células de linhagens hepáticas pré-estabelecidas que possuem maior potencial de diferenciação (Kiyota *et al.*, 2007). Desta forma, o desafio é identificar métodos que promovam sua diferenciação em linhagens hepatocitárias adultas e funcionais (Spence & Wells, 2007). Essas linhagens podem formular-se como uma proposta futura não apenas para o tratamento de doenças hepáticas, mas também na elaboração de novos medicamentos (Pouton & Haynes, 2005).

Estudos mostram que o fator de crescimento Progranulina (PGRN) pode estar envolvido na diferenciação de células-embriônicas, sendo uma proteína de grande habilidade para a indução de proliferação celular (He & Bateman, 2003), uma vez que está envolvido no desenvolvimento embrionário e neonatal (Daniel *et al.*, 2003), sendo assim, poderia estar vinculada a diferenciação de hepatoblasto em hepatócito.

A PGRN também está envolvida na sobrevivência celular (Guerra *et al.*, 2007), na tumorigênese (Tangkeangsirisin *et al.*, 2004) e no impedimento da degeneração fronto-temporal lobar (Mackenzie *et al.*, 2006; Whitwell *et al.*, 2012; Petkau *et al.*, 2012), estando presente (proteína e mRNA) em fígado e intestino de ratos cirróticos (Guerra *et al.*, 2009). Segundo Díaz-Cueto (2000) a inibição da ação da PGRN retarda a formação do blastocisto e a PGRN exógena tem a capacidade de acelerar o início da cavitação, sendo um fator de crescimento para células do trofoectoderma epitelial. Já Suzuki *et al.* (2000) mostram que o comprometimento na produção da PGRN hipotalâmica conduz a uma diferenciação sexual danificada do hipotálamo masculino.

Li *et al.* (2012) mostraram que a alta expressão da PRGN está associada com a maior angiogênese do carcinoma mamário. A PGRN atua ainda como um promissor neuroprotetor endógeno com propriedades anti-apoptóticas e anti-inflamatórias, sendo utilizado para a recuperação das funções neurológicas e motoras após o infarto cerebral (Tao *et al.*, 2012). Estudos também sugerem que a PRGN está envolvida na progressão do astrocitoma, podendo servir como um biomarcador prognóstico para o glioblastoma (Yilmaz *et al.*, 2011). Este fator está também associado com o grau de fibrose hepática em pacientes não-alcoólicos (Al-Ayadhi & Mostafa, 2011). No entanto, apesar da grande diversidade de funções atribuídas à PGRN nos últimos anos, estudos elucidando a sua relação com o processo hepatogênico ainda são escassos.

Outra proteína, o Fator Hepatocitário Nuclear 4-alfa (HNF4-alfa) é um fator de transcrição pertencente à família dos receptores do hormônio esteróide (Chen *et al.*, 2010). Estudos têm demonstrado que o HNF4-alfa age na cascata de fatores de transcrição que levam à diferenciação das células hepática, sendo então um marcador hepatocitário, que pode ser utilizado em nossos estudos. Por sua vez, O PCNA (antígeno de proliferação celular nuclear) é uma proteína que está envolvida nos processos mitóticos, sendo essencial para a replicação do DNA eucariótico e considerado um marcador da proliferação celular, por conseguinte, também presente na hepatogênese (Tan *et al.*, 1986; Bravo *et al.*, 1987; Prelich *et al.*, 1987).

Dessa forma, nossa proposta visa elucidar a ação do fator de crescimento PGRN e HNF4-alfa durante a hepatogênese em diferentes estágios embrionários em ratos (*Rattus norvegicus*) Fischer 344, visando à utilização futura como agentes diferenciadores de células embrionárias em hepatócitos, assim como, comparar os picos de expressão do PCNA com os da PGRN e HNF-4-alfa.

Material e Métodos

Fixação, inclusão e processamento histológico: Os embriões com 12,5 dias de desenvolvimento (E12,5); E13,5; E14,5; E15,5; e E16,5 foram coletados e cedidos pelo Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, Brasil, segundo as exigências do Comitê de Bioética da mesma Instituição sob número 1377/2008. O material biológico foi coletado e fixado em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético), sob condições assépticas. Os materiais cirúrgicos utilizados, a superfície de contato e o ambiente laboratorial foram esterilizados.

Após fixação por 12 horas, as amostras foram desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão do

embrião inteiro em paraplast® (Paraplast Embedding Media, Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab. USA) (Junqueira, 1995).

Foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura de todo o embrião, obtidos por meio de um micrótomo semi-automático (Leica, RM2165). Os cortes foram aderidos em lâminas histológicas, cinco por período embrionário, e deixadas em estufa (Fanen) a 60°C.

Detecção dos antígenos PGRN, HNF4-alfa e PCNA: O anticorpo primário anti-PGRN foi cedido pelo Dr. Andrew Bateman, produzido em seu laboratório – Endocrinology Laboratory/ Victoria Hospital/ McGill/ Canadá. Os cortes histológicos foram coletados em lâminas silanizadas, desparafinadas e desidratadas seguindo o protocolo padrão. As lâminas foram submetidas a três banhos de 1 minuto em H₂O destilada, e posteriormente submetidas a bloqueio por Peróxido de Hidrogênio, durante 10 minutos, repetindo 3 vezes, e em seguida foram lavadas três vezes em Tampão Fosfato (PBS) durante 3 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao procedimento de desmascaramento antigênico, utilizando Tampão Citrato (pH6.0), durante 10 minutos em microondas, seguidos por 20 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas em câmara úmida, overnight e a 4°C, contendo o controle positivo, ao qual, receberam o anticorpo primário (anti-PGRN), diluído em PBS, e controle negativo, contendo apenas PBS. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários biotinilado, durante 15 minutos, e posteriormente foram incubadas com o complexo Estreptavidina-peroxidase (LSAB-Dako) durante 30 minutos. As células positivas foram evidenciadas após a coloração com DAB (Dako) durante 5 minutos. Para detecção dos antígenos HNF4-alfa e PCNA (Santa Cruz) foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima, diferindo apenas os anticorpos primários utilizados. Para obtenção das imagens foi utilizado o microscópio OLYMPUS (modelo BX60) acoplado a câmera AxioCam (Modelo HCr, marca ZEISS).

Resultados

Imuno-histoquímica para marcação da PGRN

A imuno-histoquímica para marcação da expressão da proteína PGRN, assim como para os demais anticorpos, foi realizada e repetida para todas as fases embrionárias propostas no trabalho. A positividade das proteínas foram inferidas de modo qualitativo, de acordo com o procedimento adotado, avaliando dessa forma a intensidade da coloração marrom, que caracteriza a presença da proteína. A Anti-PGRN apresentou positividade em todos os estágios verificados (figura 1), sendo que a idade E12,5 (Figura 1b) mostrou-se menos positiva à marcação e o pico de positividade foi com E13,5 (figura 1d).

Imuno-histoquímica para marcação do HNF4- alfa

O anti-HNF4-alfa também se mostrou positivo no fígado durante todas as fases embrionárias estudadas (figura 2). Entretanto, estava altamente positivo durante as fases E12,5; E13,5 e E,14,5 (figura 2b, d e f), e baixa durante os períodos de E15,5 e E16,5 (figura 2h e j). O pico de positividade para o anti-HNF4-alfa foi em E13,5 (figura 2d).

Imuno-histoquímica para marcação do PCNA

O anti-PCNA foi positivo em todas as fases embrionárias observadas (figura 3). O PCNA teve seu pico de positividade em E12,5 (figura 3 - 12,5) e menor positividade em E13,5 (figura 3 - 13,5).

Discussão

Os resultados demonstraram primeiramente que a PGRN tem expressão no fígado durante todo o período hepatogênico estudado, no entanto, apresenta menor positividade em E12,5. Como em ratos o início da hepatogênese é por volta de E10,5 (Elmaouhoub, 2006), quando o intestino anterior e posterior tornam-se visíveis, o fato da PGRN estar pouco presente no primeiro estágio estudado (E12,5) demonstra que esse fator de crescimento

provavelmente não está relacionado com essa fase do desenvolvimento hepático. O fato da maior positividade para PGRN ser durante E13,5 pode sugerir que haja uma relação direta entre células-tronco indiferenciadas hepáticas, chamadas também de células bipotenciais ou hepatoblastos, e a PGRN. A hipótese do presente trabalho é de que a PGRN estimularia a diferenciação celular de hepatoblastos em hepatócitos durante a hepatogênese. Corroborando essa hipótese e o resultado obtido, sabe-se que entre E13,5-14,5 há a maior diferenciação de hepatoblastos em hepatócitos e células do epitélio biliar (colangiócitos) em camundongos (animal com desenvolvimento embrionário parecido com o de ratos) (Mcllin & Zorn, 2006). Além disso, é nesses períodos que ocorre a maior diferenciação morfológica das células do broto hepático em ratos (Passos, 2010). Esses resultados podem sugerir que a PGRN age direta ou indiretamente na diferenciação das células da linhagem hepática.

O HNF4-alfa, necessário para a diferenciação e desenvolvimento de hepatócitos (Maeda *et al.*, 2006), foi positivo durante todo o processo da hepatogênese estudado. Sabendo que em ratos o broto hepático começa a se desenvolver no E10 (Elmaouhoub, 2006), e que o HNF4-alfa atua como regulador central da hepatogênese através da ativação da cascata de fatores de transcrição que geram o perfil final da expressão gênica do hepatócito maduro (Watt *et al.*, 2003), é realmente de se esperar que este fator de transcrição apresente maior positividade durante o início da diferenciação dos hepatoblastos em hepatócitos em E12,5; E13,5 e E14,5, o que ocorreu em nosso estudo.

Utilizando como base o estudo de Chang *et al.* (2010) que demonstraram que a expressão de HNF4-alfa controla vários genes específicos do fígado necessários para a diferenciação hepática, assim como funções específicas do fígado maduro, presume-se que a expressão do HNF4-alfa possa estar diretamente ligada à ativação da expressão da PGRN, tendo em vista que o aumento da positividade da PGRN (em E13,5) durante a diferenciação

de hepatoblasto em hepatócito só é observada 1 dia após a expressão de HNF4-alfa em E12,5, sendo pouca a positividade da PGRN neste último período.

Sendo assim, a positividade do HNF4-alfa durante as idades embrionárias estudadas e a sincronia do seu pico de positividade com o da PGRN (em E13,5), reforça a idéia de que o fator de transcrição HNF4-alfa é indispensável para a diferenciação e desenvolvimento de hepatócitos, para a ativação de genes fígado-específicos (Chang *et al.*, 2010), e para a ativação da PGRN.

A reação imuno-histoquímica para marcação da proteína PCNA foi realizada com a finalidade de verificar a positividade dessa proteína essencial na proliferação celular, uma vez que a mesma é utilizada como marcador de atividade mitótica em diversos órgãos (Naryzhny, 2008; Strzalka, *et al.*, 2011). Para tanto, comparou-se a positividade de PCNA com os da PGRN e HNF4-alfa. A PGRN já foi evidenciada em órgãos em desenvolvimento (Li *et al.*, 1996; He & Bateman, 2003), inclusive no fígado (He & Bateman, 2003), e como fator de crescimento e indutor da proliferação celular no processo de incubação, adesão e crescimento do blastocisto (Daniel *et al.*, 2003 e Qin *et al.*, 2005). Dessa forma, a PGRN também poderia estar atuando na proliferação, e não apenas na diferenciação do fígado em desenvolvimento.

Os resultados demonstraram que há um pico de positividade de PCNA em E12,5, sendo a positividade menor nas demais idades. Tendo em vista que o embrião se encontra em desenvolvimento, com alta proliferação celular, e a que a PGRN já fora descrita como precursor de proliferação celular (Daniel *et al.*, 2003; He & Bateman, 2003; Li *et al.*, 1996; Qin *et al.*, 2005), esperava-se um pico de positividade para PCNA concomitantemente com o pico para HNF4-alfa e PGRN, denotando assim, que a PGRN teria uma função na proliferação celular durante a hepatogênese, o que não ocorreu.

Sendo assim, parece que primeiramente se tem um pico de proliferação celular em E12,5, que pode ser induzido pelo HNF4-alfa, que é altamente positivo desde E12,5 até

E14,5. Posteriormente, haveria o pico de diferenciação celular em E13,5 comandado pela PGRN após indução pelo HNF4-alfa. Corroborando essa hipótese, ambos os picos de positividade para PGRN e HNF4-alfa foram com E13,5. Em seguida (E14,5-E16,5), os níveis de positividade para PGRN, HNF4-alfa e PCNA diminuem, coincidindo com o período de maturação das células do fígado (Passos, 2010).

Conclui-se que a PGRN está presente na hepatogênese em diferentes estágios embrionários de ratos *F344* e que a mesma parece estar envolvida no processo de diferenciação de hepatoblastos em hepatócitos após sua ativação pelo HNF4-alfa, entretanto, a PGRN não parece assumir uma função de proliferação celular durante a hepatogênese, pois não apresenta seu pico de positividade em sincronia com o PCNA. Considerando a presença da PGRN durante os estágios de diferenciação celular, e a descrição bibliográfica que lhe atribui tal competência, seria possível a utilização desta proteína em futuros protocolos de diferenciação celular hepática, visando à utilização na terapia celular.

Agradecimentos

Este estudo teve o suporte da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Brasil, Departamento de Medicina Veterinária da UFPB, Brasil e Financiamento do CNPq e FAPESP.

Referências

- AL-AYADHI, L.Y. & MOSTAFA, G.A., 2011, Low plasma progranulin levels in children with autism. *J. Neuroinflammation*, 8:. 111-116.
- ALFIERI, F. & MIES, S., 2001, Transplante de órgãos: bases fisiopatológicas e técnicas, pp 158-169. In: F.S GOFFI (org), Técnicas cirúrgicas: bases anatômicas, fisiopatológicas e técnicas da cirurgia, 4 vol., 822p, Atheneu, São Paulo.

BRAVO, R., FRANK, R., BLUNDELL, P.A & MACDONALD-BRAVO, H., 1987, Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature, 326:. 515-517.

CHEN, M.L., LEE, K.D., HUANG, H.C., TSAI, Y.L., WU, Y.C., KUO, T.M., HU, C.P. & CHANG, C, 2010, HNF-4 α determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow. World J. of Gastroenterol., 16:. 5092-5103.

DANIEL, R., DANIELS, E., HE, Z. & BATEMAN, A., 2003, Progranulin (acrogranin/PC cell derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. Dev. Dyn., 227:. 593-599.

DIAZ-CUETO, L., STEIN, P., JACOBS, A., SCHULTZ, R.M. & GERTON, G.L., 2000, Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). Dev. Biol., 217:. 406-418.

ELMAOUHOUB, L., 2006, Characterization of foetal hepatic cells during the liver development. Dissertation- Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultäten, Georg August Universität zu Göttingen, Gottingen.

GUERRA, R.R., KRIAZHEV, L., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J. & BATEMAN, A., 2007, Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. Growth Factors, 25:. 280-285.

GUERRA, R.R., TROTTA, M.R., AVANZO, J.L., BATEMAN, A., ALOIA, T.P.A., DAGLI, M.L.Z. & HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J, 2009, Modulation of extracellular matrix by nutritional hepatotrophic factors in trioacetamide-induced liver cirrhosis in the rat. Braz. J. Med. Biol. Res., 42:. 1027-1034.

HE, Z. & BATEMAN, A., 2003, Progranulin (Granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. J. Mol. Med., 81:. 600-612.

JUNQUEIRA, L.C.U, 1995, Histology revisited: Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. Ciênc. Cult., 47:.. 92-95.

KIYOTA, A., MATSUSHITA, T. & UEOKA, R., 2007, Induction and high density culture of human hepatoblasts from fetal hepatocytes with suppressing transformation. Biol. Pharm. Bull., 30:.. 2308-2311.

LI, L.Q., MIN, L.S., JIANG, Q., PING, J.L., LI, J. & DAI, L.C., 2012, Progranulin expression in breast cancer with different intrinsic subtypes. Pathol. Res. Pract., 208:.. 210-216.

LI, R., HANNON, G.J., BEACH, D. & STILLMAN, B., 1996, Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. Curr. Biol., 6:.. 189-199.

MACKENZIE, I.R., BAKER, M., PICKERING-BROWN, S., HSIUNG, G.Y., LINDHOLM, C., DWOSH, E., GASS, J., CANNON, A., RADEMAKERS, R., HUTTON, M. & FELDMAN, H.H., 2006, The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. Brain, 129:.. 3081-3090.

MAEDA, Y., HWANG-VERSLUES, W.W., WEI, G., FUKAZAMA, T., DURBIN, M.L., OWEN, L.B., LIU, X. & SLADEK, F.M., 2006, Tumour supressor p53 down-regulates the expression of the human hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) gene. Biochem. J., 400:.. 303-313.

MCLIN, V.A. & ZORN, A.M., 2006, Molecular control of liver development. Clin. Liver Dis., 10:.. 1-25, 2006.

NARYZHNY, S.N., 2008, Proliferating cell nuclear antigen: A proteomics view. Cell. Mol. Life Sci., 65:.. 3789-3808.

PARK, L.K. & LEE, D.H., 2005, Bioartificial liver systems: current status and future perspective. J. Biosci. Bioeng., 99:.. 311-31.

PASSOS, C. C., 2010, Função do fator progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos *Fisher 344*, Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PETKAU, T.L., NEAL, S.J., MILNERWOOD, A., MEW, A., HILL, A.M., ORBAN, P., GREGG, J., LU, G., FELDMAN, H.H., MACKENZIE, I.R., RAYMOND, L.A. & LEAVITT, B.R., 2012, Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. Neurobiol. Dis., 45:711-722.

POUTON, C.W. & HAYNES, J.M., 2005, Pharmaceutical applications of embryonic stem cells. Adv. Drug Deliv. Rev., 57: 1918-1934.

PRELICH, G., TAN, C.K., KOSTURA, M., MATHEWS, M.B., SO, A.G., DOWNEY, K.M. & STILLMAN, B., 1987, Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. Nature, 326: 517-520.

QIN, J., DIAZ-CUETO, L., SCHWARZE, J.E., TAKAHASHI, Y., IMAI, M., ISUZUGAWA, K., YAMAMOTO, S., CHANG, K.T., GERTON, G.L. & IMAKAWA, K., 2005, Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse. Biol. Reprod., 73: 434-442.

SPENCE, J.R. & WELLS, J.M., 2007, Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. Dev. Dyn., 236: 3218-3227.

STRZALKA, W. & ZIEMIENOWICZ, A., 2011, Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. Ann. Bot., 107: 1127-1140.

SUZUKI, M., BANNAI, M., MATSUMURO, M., FURUHATA, Y., IKEMURA, R., KURANAGA, E., KANEDA, Y., NISHIHARA, M. & TAKAHASHI, M., 2000, Suppression of copulatory behavior by intracerebroventricular infusion of antisense oligodeoxynucleotide of granulin in neonatal male rats. Physiol. Behav., 68: 707-713.

TAN, C.K., CASTILLO, C., SO, A.G. & DOWNEY, K.M., 1986, An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. J. Biol. Chem., 261:. 12310-12316.

TANGKEANGSIRISIN, W., HAYASHI, J. & SERRERO, G., 2004, PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells. Cancer Res., 64:. 1737-1743.

TAO, J., JI, F., WANG, F., LIU, B. & ZHU, Y., 2012, Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. Brain Res., 1436:. 130-136.

WATT, A.J., GARRISON, W.D. & DUNCAN, S.A., 2003, HNF4: A central regulator of hepatocyte differentiation and function. Hepatology, 37:. 1375-1384.

WHITWELL, J.L., WEIGAND, S.D., BOEVE, B.F., SENJEM, M.L., GUNTER, J.L., DEJESUS-HERNANDEZ, M., RUTHERFORD, N.J., BAKER, M., KNOPMAN, D.S., WSZOLEK, Z.K., PARISI, J.E., DICKSON, D.W., PETERSEN, R.C., RADEMAKERS, R., JACK, C.R.JR. & JOSEPHS, K.A., 2012, Neuroimaging signatures of frontotemporal dementia genetics: C9ORF72, tau, progranulin and sporadics. Brain, 135:. 794-806.

YILMAZ, Y., EREN, F., YONAL, O., POLAT, Z., BACHA, M., KURT, R., OZTURK, O. & AVSAR, E., 2011, Serum progranulin as an independent marker of liver fibrosis in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. Dis. Markers, 31: 205-210.

Legendas de Figuras

Figura 1. Reação imuno-histoquímica + coloração de hematoxilina para marcação de anti-progranulina no fígado de embriões de ratos Fischer 344 em diferentes prazos gestacionais (E12,5; E13,5; E14,5; E15,5 e E16,5). Controle – controle negativo sem anticorpo. Barras = 200 μm .

Figura 2. Reação imuno-histoquímica + coloração de hematoxilina para marcação de anti-HNF-4 α no fígado de embriões de ratos Fischer 344 em diferentes estágios gestacionais (E12,5; E13,5; E14,5; E15,5 e E16,5). Controle – controle negativo sem anticorpo. Barras = 200 μm .

Figura 3. Reação imuno-histoquímica para PCNA + coloração de hematoxilina. As fotomicrografias do broto hepático seguem com suas respectivas idades embrionárias (12,5; 13,5; 14,5; 15,5 e 16,5). As setas representam a marcação nuclear positiva para hepatócitos ou hepatoblastos. Um fígado demonstrando 2 lobos identificado na figura 15,5. Como controle positivo da reação foi usado o duodeno do animal correspondente (dado não mostrado).

Figura 1.

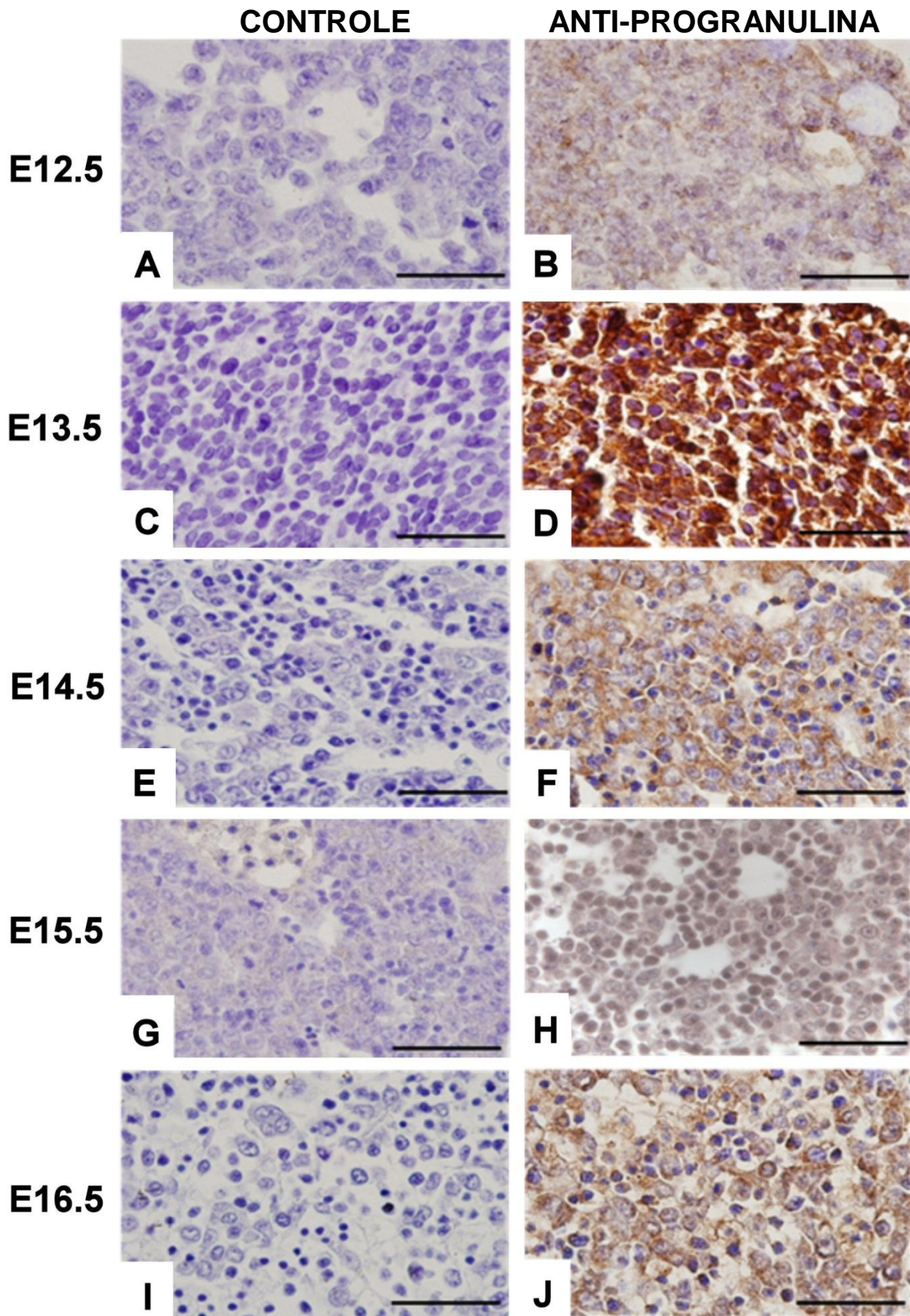


Figura 2.

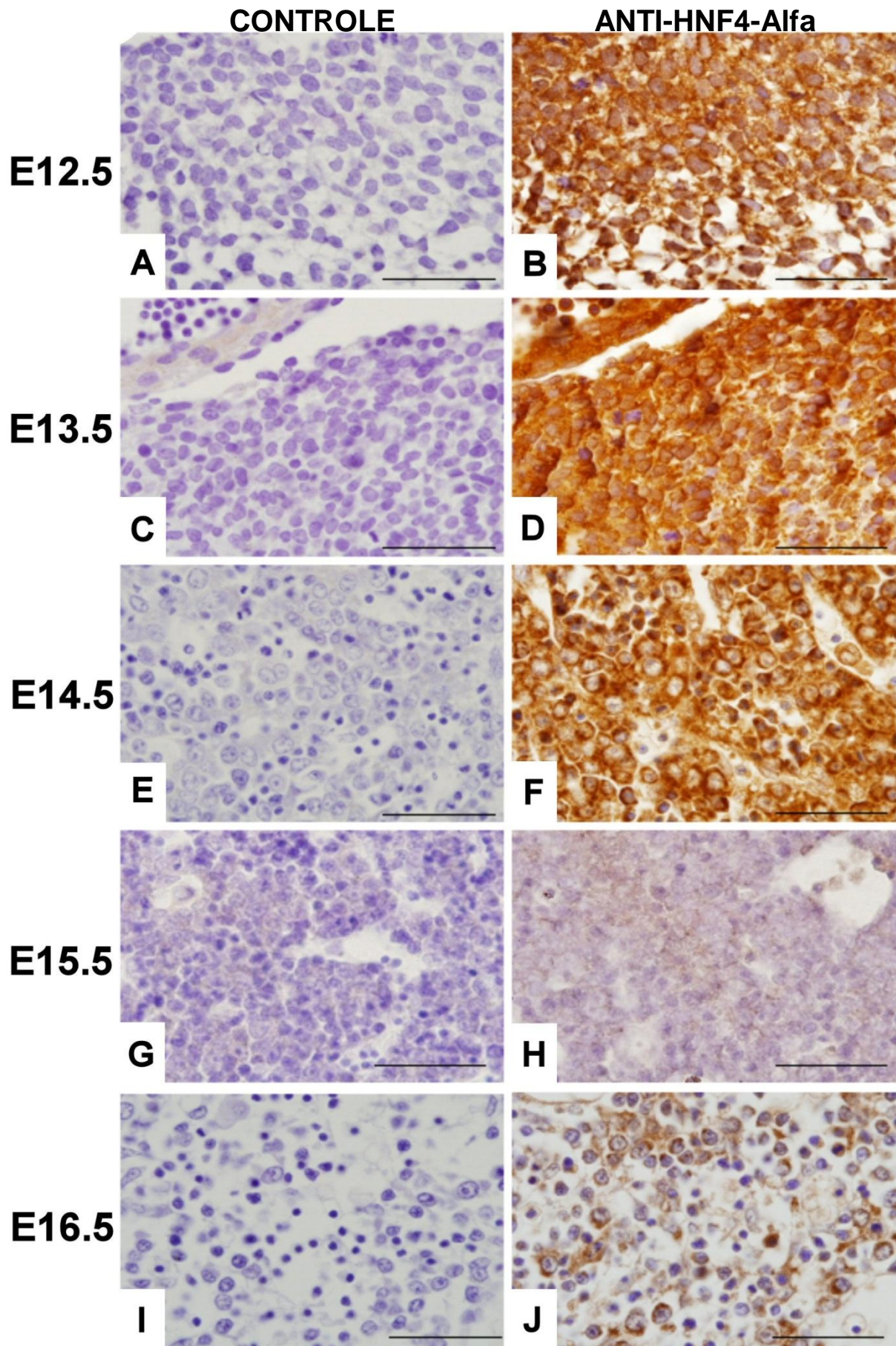
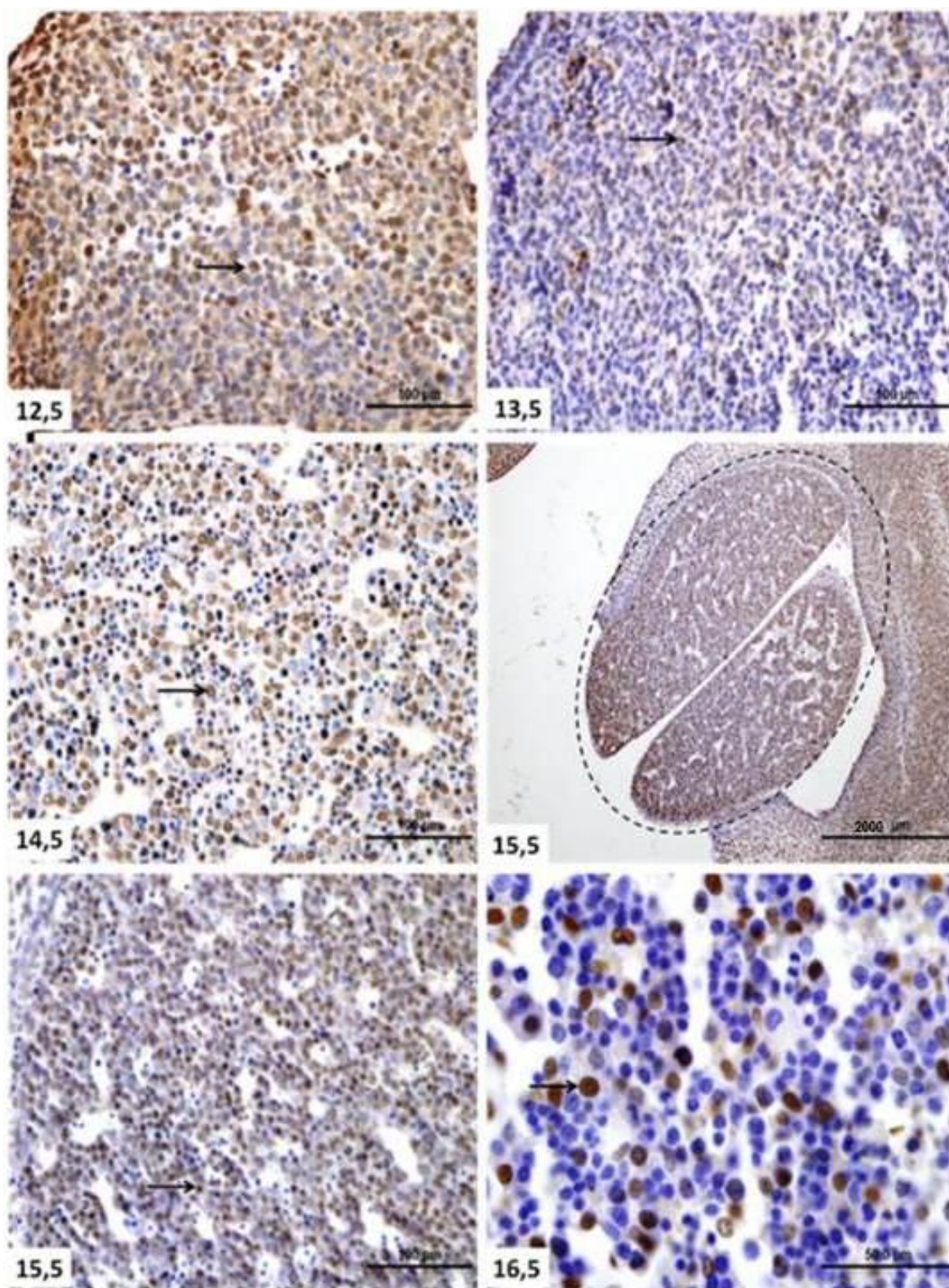


Figura 3.



Manuscrito 2

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO HEPÁTICO EM DIFERENTES ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS EM RATOS

Resumo

Os ratos apresentam desenvolvimento embrionário similar ao de animais domésticos e humanos, sendo assim um modelo válido para estudos científicos. Dentre eles, o *F344* se destaca por ser uma linhagem isogênica, facilitando a leitura dos resultados obtidos devido sua homogeneidade gênica. Devido à falta de estudos histológicos acerca do desenvolvimento hepático em ratos, o presente estudo tem como objetivo caracterizar histologicamente, pela primeira vez, o processo de desenvolvimento hepático nos estágios embrionários de E12,5 (12,5 dias de gestação), E13,5, E14,5, E15,5 e E16,5 em ratos *F344*. Cinco embriões de cada estágio embrionário foram coletados, fixados em Metacarn, incluídos em paraplast e realizadas colorações histológicas. Os brotos hepáticos de embriões entre 12,5-14,5 dias apresentaram-se como aglomerados de hepatoblastos ainda desorganizados e circundados por inúmeras células precursoras sanguíneas nucleadas. Observou-se que os hepatoblastos possuem um núcleo grande basofílico e pouco citoplasma. Sinusóides com eritroblastos e células de Kupffer também foram encontrados. Com 14,5 dias foi observado a coexistência de hepatoblastos e hepatócitos, além de megacariócitos. Nos embriões com 15,5 dias já é possível distinguir os cordões de hepatócitos, ainda em formação, os quais se encontram limitados pelos capilares sinusóides. Com 16,5 dias a arquitetura parenquimal estava mais próxima daquela encontrada em fígados adultos, sendo a quantidade de hepatócitos superior à de hepatoblastos. Neste prazo gestacional o fígado ainda apresentava função hematopoiética. O estudo traz histologicamente o desenvolvimento hepático entre 12,5-16,5 dias de ratos da

linhagem *F344*, evidenciando as células que compõem cada período gestacional e gerando subsídios para futuros estudos.

Palavras-chave: hepatócitos, hepatogênese, histologia, isogênia.

Abstract

The rats have embryonic development similar to other domestic animals and humans and is thus a valid model for scientific studies. The *F344* stands out for being isogenic, facilitating the reading of the results obtained because of their genetic homogeneity. Due to the lack of histological studies concerning hepatic development in rats, the present study aimed to characterize histologically for the first time the process of development liver in the stages of gestation of E12.5 (12.5 days of gestation), E13.5, E14.5, E15.5 and E16.5 in rats *F344*. Five embryos of each embryonic stages were collected, fixed in Metacarn, embedded in Paraplast and histological stains were performed. The hepatic bud of embryo among 12.5-14.5 days presented a cluster of hepatoblasts still disorganized and surrounded by numerous nucleated blood precursor cells. The hepatoblasts presented a large nucleus basophilic and little cytoplasm. Sinusoids with erythroblasts and Kupffer cells have also been found. At 14.5 days the coexistence of hepatoblasts and hepatocytes was observed. In the 15.5 embryos it was visible the distinction between the cords of hepatocytes in formation limited by capillary sinusoids. The parenchymal architecture was closer to that found in the adult liver at 16.5 days, and the quantity of hepatocytes was greater than hepatoblasts. During gestation period the liver also had hematopoietic function. The study shows the histological hepatic development the of rats *F344* between 12.5-16.5 days, evidencing the cells that comprise each gestational period and possibly subsiding future studies.

Key words: hepatocytes, hepatogenesis, histology, isogenia.

Introdução

O desenvolvimento embrionário dos vertebrados tem sido foco de estudos durante muito tempo, entretanto, apenas nas últimas duas décadas foi que houve um enorme progresso no estudo da definição das linhagens celulares, do potencial de desenvolvimento celular em embriões jovens e na compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a modelagem e diferenciação celular (Passos, 2010). Apesar desses esclarecimentos, as características histológicas do desenvolvimento embrionário ainda continuam sendo uma lacuna, principalmente de órgãos de origem endodérmica como o fígado.

O fígado é o segundo maior órgão do corpo e a maior glândula, sendo um órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos, sendo, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue (Junqueira & Carneiro, 2004). O processo de formação do fígado é composto por múltiplos estágios de desenvolvimento; durante este último à indução da destinação hepática depende de interações recíprocas entre o endoderma ventral do intestino anterior e o tecido mesenquimal adjacente (Zaret, 2002). Em ratos, o desenvolvimento embrionário é similar ao dos outros vertebrados e o início da gastrulação ocorre durante o oitavo dia de gestação (E8,5). A formação dos somitos começa no final de E9,5 e início de E10,5, quando o intestino anterior e posterior tornam-se visíveis e o processo de desenvolvimento hepático se inicia. Este processo se dá pela conectividade do endoderme do intestino anterior com o desenvolvimento do coração (Elmaouhoub, 2006).

Por volta de E8, em camundongos, a parede ventral do endoderma do intestino anterior inicia seu desenvolvimento para uma destinação hepática em resposta às ações indutivas de fatores de crescimento. Dentre eles, o fator de crescimento fibroblástico (FGF) é liberado pelo mesoderma cardíaco adjacente e pelas BMPs (proteínas morfogenéticas do osso) advindas do mesênquima do septo transversal (Duncan, 2003; Baharvan *et al.*, 2006; Cai *et*

al., 2007; Zorn, 2008). Aproximadamente em E9 as células do endoderma do intestino anterior já iniciaram a proliferação e diferenciação em hepatoblasto, levando à formação do broto hepático neste estágio (Zhao & Duncan, 2005; Zorn, 2008). Após a formação do broto hepático (BH) e a migração dos hepatoblastos do intestino anterior para formar cordões em direção ao septo mesenquimal transversal, as células dentro do ambiente hepático embrionário se organizam para uma segunda diferenciação celular, gerando uma arquitetura hepática complexa (Zhao & Duncan, 2005).

Em ratos (*Rattus norvegicus*), o que se tem descrito quanto às características histológicas do desenvolvimento hepático é que o BH começa a se desenvolver com 10,5 dias de gestação. Nesse período as células hematopoiéticas saem do fígado para suas destinações finais e o fígado inicia a organização de sua estrutura e desenvolve numerosas funções metabólicas, tornando-se maduro (Elmaouhoub, 2006). Embora o desenvolvimento embrionário de ratos e camundongos, principalmente os últimos, seja relativamente bem compreendido atualmente, as características histológicas hepáticas são ainda uma lacuna no conhecimento.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar histologicamente o processo de desenvolvimento hepático embrionário em ratos.

Material e Métodos

Animais: Este trabalho foi aprovado pelo comitê de bioética da FMVZ/USP, protocolado sob o nº 1377/2008. Para o estudo foi utilizada a linhagem de ratos isogênicos *Fischer 344*.

Acasalamentos e obtenção dos embriões: Os acasalamentos das ratas isogênicas *F344* para obtenção dos embriões em diferentes períodos gestacionais foram realizados após verificação do ciclo estral das mesmas. Após a junção dos casais, na manhã seguinte, realizou-se a lavagem vaginal com solução fisiológica 0,9% para verificação da presença de

espermatozoides, em lâminas histológicas, com auxílio de microscópio de luz. Havendo a presença de espermatozoides no lavado vaginal, deu-se início a contabilização da idade gestacional 0,5 (E0,5). Cinco embriões de ratos *F344* de cada período gestacional (E12,5; E13,5; E14,5; E15,5; e E16,5) foram coletados após eutanásia das ratas com a utilização de isoflurano por tempo prolongado.

Processamento das amostras: Os embriões coletados foram fixados em Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético) por 12 horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série de etanóis em concentrações crescentes e diafanizados em xilol, seguido de inclusão (Junqueira, 1995) em paraplast® (Paraplast Embedding Media, Paraplast Plus, Sigma, Oxford Lab. USA). Foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura obtidos através de um micrótomo semi-automático (Leica, RM2165).

Colorações histológicas: Foram realizadas as seguintes colorações: Hematoxilina-eosina, tricômio de Masson (Bancroft,1996), PAS (Periodic Acid Schiff) (Bancroft, 1996) e picrossírius. Para obtenção das imagens foi utilizado o microscópio OLYMPUS (modelo BX60) acoplado a câmera AxioCam (Modelo HCr, marca ZEISS).

Resultados

Com E12,5 dias (figura 1a) os embriões de rato *Fischer* 344 (*F344*) apresentaram BH em início de desenvolvimento, sendo visíveis dois segmentos do BH, precursor do fígado adulto. Neste período o BH é constituído pelos hepatoblastos (figura 2a). O período com 13,5 dias (figura 1b), não apresenta distinção significativa comparada ao período anterior, diferindo apenas no formato dos hepatoblastos, e por apresentar micro região de células sanguíneas em processo de maturação (figura 2b).

Com E14,5 dias, o BH apresenta quatro lobos hepáticos distintos (figura 1c); histologicamente é possível evidenciar hepatoblastos e hepatócitos concomitantemente, além

de megacariócitos, que são células com núcleos multilobulados precursoras das plaquetas (figura 2c).

Em embriões com 15,5 e 16,5 dias (figura 1d, e) fica notório o aumento de volume dos BHs nos embriões, os quais já possuem aspecto morfológico semelhante a um fígado maduro, permitindo seu isolamento com maior facilidade, quando necessário experimentalmente, utilizando instrumentos microcirúrgicos (Guerra *et al.*, 2009). Histologicamente é possível observar em E15,5 (figura 2d) os hepatócitos binucleados, as células de Kupffer, eritroblastos e eritrócitos, e inúmeros sinusóides em formação. Em E16,5 (figura 2e) observa-se os hepatócitos se organizando em cordões hepatocitários, nos quais possuem grande quantidade de hepatócitos, evidencia-se ainda neste período, células de Kupffer, sinusóides com eritrócitos em seu lúmen e megacariócito.

Discussão

Em embriões com 12,5 o BH é constituído por células-tronco bipotenciais, os hepatoblastos (figura 2a). Segundo Kiyota *et al.* (2007) estas células são capazes de extensiva proliferação, e subsequente diferenciação em células do ducto biliar e hepatócitos (Thonson *et al.*, 1998). Tais células apresentam núcleo grande basófilo e pouco citoplasma (figura 2a, b) como descrito na literatura (Oh *et al.*, 2005). Os embriões com 13,5 dias (figura 2b) apresentaram células mais fusiformes, possivelmente devido à eminente diferenciação em hepatócito (figura 2b), fato esse também observado no cultivo celular (Guerra *et al.*, 2009).

Na fase de E14,5, foram também observados eritoblastos, células sanguíneas precursoras de eritrócitos, ainda nucleadas, pois o fígado é o primeiro órgão hematopoiético depois do saco vitelino (figura 2c), assumindo essa função até a formação da medula óssea (Moore & Persaud, 2008).

Nos embriões com 15,5 dias (figura 2d) verificou-se, assim como naqueles com 14,5, a coexistência de hepatoblastos e das células já diferenciadas, os hepatócitos. Em embriões com 15,6 dias a arquitetura hepática começa a ser alterada com a formação de inúmeros sinusóides. Neste prazo gestacional também é possível observar, dentro dos sinusóides, células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, além de células de Kupffer, aderidas principalmente à porção luminal das células endoteliais dos sinusóides (região perissinusoidal), estando suas características morfológicas e posição em consonância com o encontrado na literatura (Lopez *et al.*, 2011).

Com 16,5 dias (figura 1e e 2e) a quantidade de hepatócitos é maior em detrimento à hepatoblastos, representando a grande maioria das células do órgão em maturação. Neste prazo é possível observar de forma nítida a formação dos cordões de hepatócitos que confluem para as veias centrolobulares. Estas são características de um fígado maduro, notório pela formação dos lóbulos hepáticos, unidade funcional hepática (Junqueira & Carneiro, 2004). Também são observados ramos da veia porta, que fazem parte do espaço porta, o qual fica entre os lóbulos hepáticos (Junqueira & Carneiro, 2004). Neste período (E16,5) o fígado, ainda, possui função hematopoiética, uma vez que são encontradas células da linhagem sanguínea em diferentes estágios de diferenciação no parênquima hepático. Como a diferenciação final da linhagem celular hepática, em camundogos, ocorre até os 17,5 dias (McIn & Zorn, 2006), é de se esperar que o processo de diferenciação final nos ratos ultrapasse tal prazo gestacional.

Os resultados demonstram histologicamente pela primeira vez o desenvolvimento hepático de embriões de ratos entre 12,5-16,5 dias, evidenciando as células que compõem cada período gestacional. Os resultados apresentados poderão trazer subsídios para futuros estudos embrionários, hepáticos ou de terapia celular utilizando-se esse promissor modelo animal.

Referências

- BAHARVAND, H., HASHEMI, S.M., KAZEMI-ASHTIANI, S. & FARROKHI, A., 2006, Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. Int. J. Dev Biol., 50:. 645-652.
- BANCROFT, J.D. & STEVENS, A.S., 1996, Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, Edinburgh, 4 vol., 740p.
- CAI, J., ZHAO, Y., LIU, Y., YE, F., SONG, Z., QIN, H., MENG, S., CHEN, Y., ZHOU, R., SONG, X., GUO, Y., DING, M. & DENG, H., 2007, Directed Differentiation of human Embryonic Stem Cells into Functional Hepatic Cells. Hepatology, 45:. 1229-1239.
- DUNCAN, S.A., 2003, Mechanisms controlling early development of the liver. Mech. Dev., 120:.19-33.
- ELMAOUIHOUB, L., 2006, Characterization of foetal hepatic cells during the liver development. Dissertation - Mathematisch naturwissenschaftliche Fakultäten, Georg August Universität zu Göttingen.
- GUERRA, R.R., BAPTISTA, A.B., MORITA, E.L., PASSOS, C.C., VALVERDE, C.W., CARVALHO, C.E., ALVES, F.R., KERKI, I., MARIA, D.A., GOLDBERG, A.C., SGAYAR, M.C. & MIGLINO, M.A., 2009, Isolation and characterization of stem cells committed to the liver lineage for bridge transplantation. In: Congress of the International Federation of Associations of Anatomists, 17., 2009, Cape Town. Anais... Cape Town: 17th Congress of the International Federation of Associations of Anatomists.
- JUNQUEIRA, L.C.U, 1995, Histology revisited: Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. Ciênc. Cult., 47:. 92-95.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J., 2004, Histologia Básica, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10 vol., 488p.

- KIYOTA, A., MATSUSHITA, T. & UEOKA, R., 2007, Induction and high density culture of human hepatoblasts from fetal hepatocytes with suppressing transformation. Biol. Pharm. Bull., 30: 2308-2311.
- LOPEZ, B.G., TSAI, M.S., BARATTA, J.L., LONGMUIR, K.J. & ROBERTSON, R.T., 2011, Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. Comp. Hepatol., 10: 2-10.
- MCLIN, V.A. & ZORN, A.M., 2006, Molecular control of liver development. Clin. Liver Dis., 10: 11-25.
- MOORE, K.L. & PERSAUD, T.V.N., 2008, Embriologia Básica. Elsevier, Rio de Janeiro, 8 vol., 576p.
- OH, S.K., KIM, H.S., AHN, H.J., SEOL, H.W., KIM, Y.Y., PARK, Y.B., YOON, C.J., KIM, D.W., KIM, S.H. & MOON, S.Y., 2005, Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. Stem Cells., 23: 211-219.
- PASSOS, C. C., 2010, Função do Fator progranulina na diferenciação e proliferação de células de linhagem hepática, durante o desenvolvimento embrionário de ratos Fisher 344, Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- THONSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S. & JONES, J.M., 1998, Embryonic Stem Cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145-1147.
- ZARET, K.S., 2002, Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. Nat. Rev. Genet., 3: 499-512.
- ZHAO, R. & DUNCAN, S.A., 2005, Embryonic development of the liver. Hepatology, 41: 956-967.

ZORN, A.M., 2008, Liver development: StemBook. Cambridge: The Stem Cell Research Community. Disponível: <<http://www.stembook.org/node/512>>. Acesso em: 16 ago. 2012.

Agradecimentos

Este estudo teve o suporte da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Brasil, Departamento de Ciências Veterinárias da UFPB, Brasil, e Financiamento do CNPq e FAPESP.

Legendas de Figuras

Figura 1: Fotomicrografias de embriões de ratos *F344* em diferentes estágios embrionários (E12,5; E13,5; E14,5; E15,5; E16,5) com estruturas identificadas. **a-** E12,5, CR: 7,23±0,16 mm. **b-** E13,5, CR: 9,51 mm. **c -** E14,5, * Junção dos dois segmentos hepáticos (também indicado por seta), CR: 12,34±1,30 mm. **d-** E15,5. **e-** E16,5. **a, b, e-** Coloração de hematoxilina-eosin, **c-** Coloração de ácido periódico de Schiff (PAS), **d-** Coloração de tricômio de Masson.

Figura 2: Fotomicrografias de fígados (broto hepático) de embriões de ratos *F344* em diferentes estágios embrionários. **(a)** E12,5: 1- hepatoblastos. **(b)** E13,5: 1 e 2- Hepatoblastos, 3- Micro região de células sanguíneas em processo de maturação. **(c)** E14,5: 1- Megacariócitos, 2- Hepatócitos, 3- Células de Kupffer. **(d)** E15,5: 1 e 2- Células de Kupffer, 3- Hepatócito binucleado, 4- Eritrócito em sinusóide, 5- Eritroblasto em sinusóide. **(e)** E16,5: Observa-se hepatócitos se organizando em cordões hepatocitários, 1- Células de Kupffer; 2- Sinusóide com eritrócito em seu lúmen; 3- Megacariócito, 4- Hepatócito. **a, b, d, e -** Coloração de hematoxilina e eosina, **c)** Coloração de picrossírius.

Figura 1.

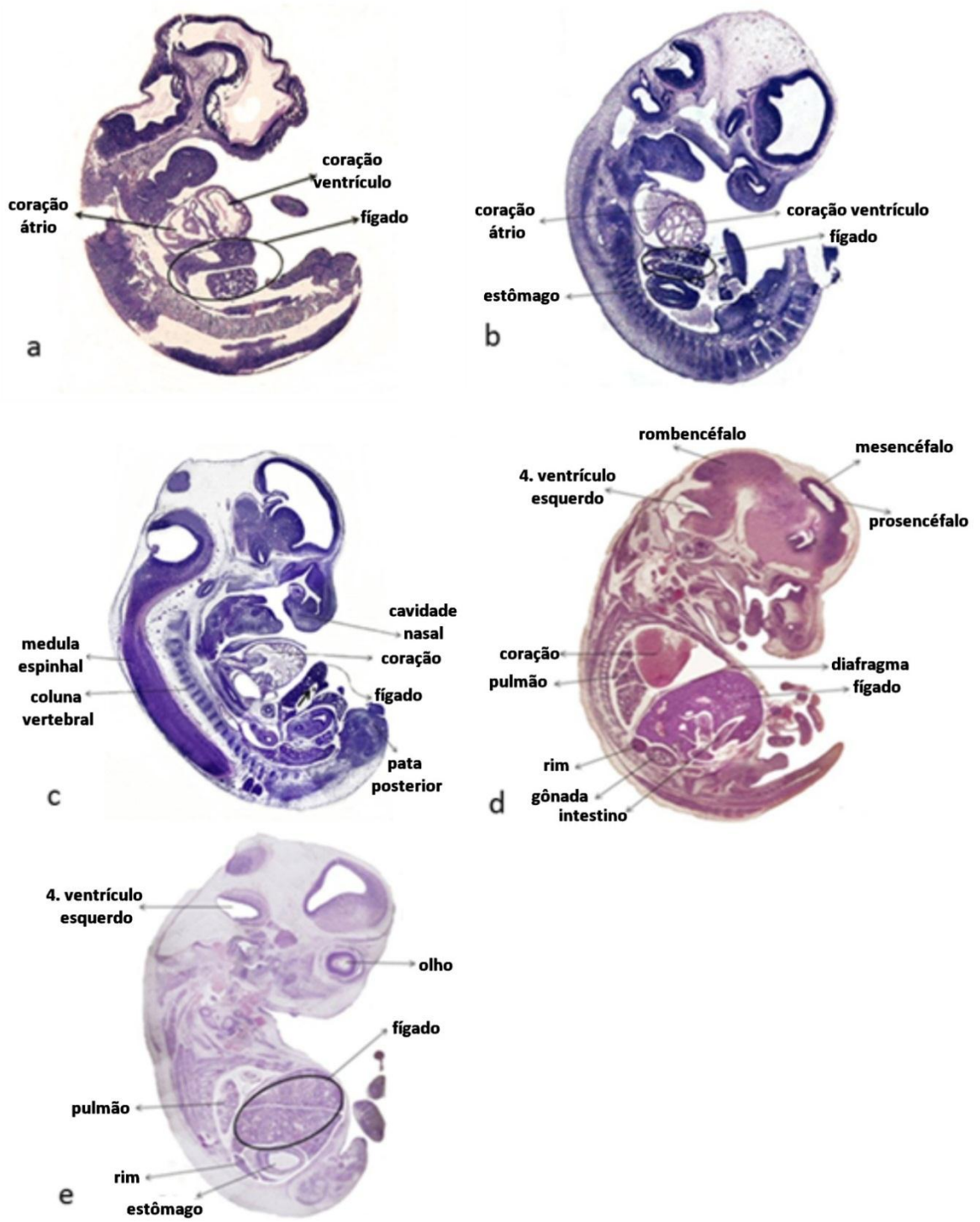


Figura 2.

