CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU

Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e
medula óssea de fetos caninos

São Paulo

2009

CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU

Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2224
FMVZ

Wenceslau, Cristiane Valverde

Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos / Cristiane Valverde Wenceslau. -- 2010.
197 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Célula progenitoras. 2. Cães. 3. Fígado. 4. Medula óssea. 5. Saco vitelino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise de células mesenquimais do saco vitelino, medula óssea e fígado de feto canino, (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)", protocolado sob o nº931/2006, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade da Profa Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Analysis of mesenchymals cells of yolk sac bone marrow and liver of canine embryo, (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)", protocol number 931/2006, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise de células mesenquimais do saco vitelino, medula óssea e fígado de feto canino, (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)", protocolado sob o nº931/2006, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade da Profa Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Analysis of mesenchymals cells of yolk sac bone marrow and liver of canine embryo, (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)", protocol number 931/2006, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WENCESLAU, Cristiane Valverde

Título: Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição _____
Assinatuta: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Neusa e Marcos por me apoiarem sempredurante toda a minha
vida.....obrigada por tudo!!!!!!
Amo vocês*

DEDICATÓRIA

Aos meus avós Pedrinha e Benedicto pelo carinho, afeto e dedicação.

*Agradeço as minhas irmãs Beatriz, Patrícia e irmão Marcos pela compreensão dos
períodos de ausência e pelos momentos de alegria.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A palavra orientação implica em alcançar um destino final, para isto podemos percorrer o trajeto com a utilização de meios que facilitem a nossa chegada. Neste caso a bússola é um instrumento que nos auxilia para atingirmos o objetivo final, que é a chegada. É desta forma que vejo a Profª Maria Angélica: como uma bússola, ela nos orienta e nos apresenta os caminhos, só basta a nós percorrermos e alcançarmos o destino final.

A Dra. Irina Kerkis que me acolheu com muito carinho, orientou, ensinou e me ajudou a alcançar o meu destino final.

Ao casal Ambrósio (Caju e Dani) por todo este período de convivência.....agradeço não somente pelo ajuda e incentivo, mas também pela amizade, amparo e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Nadezda pelos ensinamentos e auxílio na confecção do cariótipo.

A Prof. Patricia pelo aprendizado e convivência no laboratório.

Ao Alexandre Kerkis pelos ensinamentos e dicas de microscopia eletrônica de transmissão

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS AOS AMIGOS

As companheiras de casa Fernanda e Marina pela convivência, por compartilharem bem de perto toda a minha vida, e por me agüentarem sempre..... obrigado por tudo meninas.

Ao melhorzinho lá de cima (Sarmento), pelas conversas, risadas, caronas, almoços.....obrigado por você ser quem você é.

Aos amigos Drika, André e Phelipe pela amizade e por dividirem as tristezas e alegrias da Pós-Graduação ... muito obrigada por tudo meninos!

Ao Nelson pela imensa ajuda e dedicação durante a realização do doutorado e pela amizade e companheirismo.

A alegre amiga Graciela por estar sempre ajudando de forma generosa.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Flávio ribeiro Alves, foi muito bom conviver com você na pós-graduação.

Matheus, Gui, Buson, Ana Luiza, Rosa Cabral, por realizar as castrações para coleta de material biológico.

Ao Dr. Gustavo e sua equipe pelo fornecimento de úteros gestantes.

As companheiras de coleta de Material biológico Fernanda e Camila.

Aos colegas, do Butantan Enrico, Babyla, Bruna, Lislely, Fernando, Carlos, Claudinéia, Cicéra, Suely e Alexandre Pereira, por me receberem no laboratório, sempre me ajudando.

A Renata por compartilhar as frustrações de coleta de material biológico e processamento do material...

Ao Marcio, por me ajudar nas correções da Tese na reta final do Doutorado.

Ao Prof. José Roberto e as meninas do laboratório LITIAM pelo uso dos equipamentos e Laboratório.

A Isabella, Carol, Leandro e Flávia, por ajudarem na organização do Laboratório de Células-tronco.

A toda equipe do canil do período de janeiro de 2006 a janeiro de 2009, pelas trocas de plantões e quebra galhos.

AGRADECIMENTOS

O Augusto pelas sabias palavras.

Ao sr Gaspar por realizar os cortes ultrafinos dos blocos de transmissão

Aos funcionários da FMVZ Maicon, Tati, Jaqueline, Índio, Ronaldo, Sandra, Diog

Aos funcionários do Butantan Zenaíde, Vera , Diva.

A técnica do biotério IPEN Neide.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

Lista de Abreviaturas

ALB- *do inglês serum albumin*

AFB- *do inglês alfatoxin B*

Alfa-MEM- *do inglês Minimum Essential Medium Alpha*

BSA- *do inglês Bovine Serum Albumin*

CD- grupo de diferenciação. É um sistema de classificação para anticorpos monoclonais gerados em diferentes laboratórios para epítomos contra moléculas de superfície celular de leucócitos, estabelecido em 1982 pelo 1st *International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens* (HLDA).

CD44- é uma proteína de superfície celular envolvida com as interações celulares, adesão celular e migração. Expressa em células hematopoiéticas, não hematopoiéticas, células epiteliais e em baixos níveis em leucócitos.

CD45- Proteína tirosina fosfatase, comum em leucócitos. É um tipo de proteína de transmembrana presente em células hematopoiéticas diferenciadas, com exceção de eritrócitos e células plasmáticas.

CD13- aminopeptidase alanina. Reconhecem células granulocíticas e monocíticas, células progenitoras.

CD14- proteína componente do sistema imune inato. Expressa por macrófagos e granulócitos neutrófilos.

CD29- beta integrinas são receptores de membrana responsáveis pela interação intercelulares e matriz extracelular.

CD31- glicoproteína. É expressa em plaquetas, granulócitos, monócitos e células endoteliais.

CD33- receptor de transmembrana, expressa em células de linhagem mielóide e monocítica.

CD34- reage com células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais da medula óssea.

CD90- antígeno de superfície celular Thy-1. Pode ser utilizada como marcador para uma variedade de tipos de células-tronco e para neurônios maduros.

CD117- receptor C-kit. Expressada em superfície de células progenitoras hematopoiéticas células tímicas, hepatócitos.

CD146- O grupo de diferenciação, também conhecido como molécula adesão celular melanoma. É freqüentemente utilizado como marcador de linhagem endotelial e para pericitos.

CFU-f – unidades formadoras de colônia do inglês *colony forming units-fibroblastic* CFU-f.

c-kit- mesmo que CD117 do inglês *cytokine receptor*

CO₂- dióxido de carbono.

CYP1A1- do inglês *anti-cytochromo P450 1A1*

DMEM-H- Dulbeccos Modified Eagle Médium- High glucose

DMEM-L- Dulbeccos Modified Eagle Médium- Low glucose

DAPI- 40,6-diamidino-2- phenylindol

DMSO- Dimetil Sulfóxido

FITC- do inglês *fluorescein isothiocyanate*.

HLA- do inglês *Human Leucocyte Antigen*

Lf32- do inglês *antiosteocalcin*

LIF- do inglês *leukocyte inhibitory factor*

LPC- do inglês *Lysophosphatidylcholine*

KRT18- *do inglês keratin-18*

IgG- imunoglobulina da classe G

mg/mL- miligramas por mililitro

mL- mililitro

mM- milimol

NANOG- *do inglês, nanog homeobox, em referência à Tir Nan Og*

Oct-3/4-*do inglês, octamer 4*

PBS-L- PBS livre de cálcio- *do inglês phosphate buffered saline*

PROM1- *do inglês Prominin 1*

rpm rotações por minuto

Rex-1- fator de transcrição expresso em células-tronco embrionárias de camundongos

Sca-1- *do inglês stem cell antigen 1.*

SFB- Soro fetal Bovino

SOX2- o mesmo que SRY box2, *do inglês, sex determining region Y-2*

SSEA-1- *do inglês, stage specific embryonic antigen 1*

SSEA4 *do inglês, stage specific embryonic antigen 4*

SH2= o mesmo que CD105

SH3= o mesmo que CD73

SH4= o mesmo que CD73

Stro-1 do inglês, *stromal cell surface antigen 1*

TGFB- do inglês *Transforming growth factor-beta*

T25- garrafas de cultivo com tamanho de 25cm³

T75- garrafas de cultivo com tamanho de 75cm³

TUBB3- do inglês, *tubulin, beta3*

□ **g-** micrograma

□ **m** micrômetro

□ **M** micro mol

vWF- do inglês “*von Willebrand factor*”

RESUMO

WENCESLAU, C. V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos.** [Analysis of mesenchymal cells from yolk sac, liver and bone marrow of the canine fetus]. 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Em vista das limitações éticas em torno da obtenção de células-tronco de fetos humanos, o cão é uma alternativa para estes estudos. Além disso, a terapia celular proporciona novas expectativas para o tratamento na espécie. Realizamos o estudo comparativo das células isoladas de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos. As células foram analisadas microscopicamente e ultra estruturalmente. O imunofenótipo das células foi avaliado através de marcadores. Caracterizamos a plasticidade, o cariótipo e o potencial teratogênico destas células. Após expansão as células progenitoras formaram colônias com morfologia fibroblastóide. As células progenitoras do saco vitelino e medula óssea são compostas por: células com alta proporção núcleo-citoplasma e células com citoplasma rico em organelas, enquanto que as células progenitoras do fígado eram semelhantes à célula epitelial e células ricas em organelas. As células-progenitoras dos três tecidos fetais foram positivas para os anticorpos nestina e vimentina, mas negativas para CD45 e CD13. Células progenitoras de medula óssea foram positivas para o marcador CD44. Células progenitoras do fígado e medula óssea expressaram a proteína citoqueratina-18, enquanto as do saco vitelino expressaram ve-caderina. Células positivas para Oct3/4 foram detectadas em todas as células progenitoras. As células-progenitoras do saco vitelino e medula óssea diferenciaram-se em tecidos ósseo, cartilaginoso e muscular; já as do fígado para tecido ósseo e muscular. Nenhum tipo celular diferenciou-se em adipócitos. As células progenitoras da medula óssea diferenciaram em células semelhantes a neurônios. Sugere-se a presença de progenitores semelhantes a células mesenquimais e epiteliais. Todas as células mantiveram o cariótipo estável e não formaram tumores. Células progenitoras de medula óssea apresentaram maior capacidade de proliferação e diversidade de diferenciação. Sugere-se que estas células são possíveis candidatas para a terapia celular.

Palavras-chave: Célula progenitoras. Cães. Fígado. Medula óssea. Saco vitelino.

ABSTRACT

WENCESLAU, C. V. **Analysis of mesenchymal cells from yolk sac, liver and bone marrow of the canine fetus.** [Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos]. 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The use the human fetuses for stem cells isolation have ethical limitations. In this context the dog is an excellent candidate to fetal stem cells. Furthermore, these cells can be used in cell therapy of canine diseases We aimed at isolation and comparative characterization of progenitor cells from yolk sac, liver and bone marrow of canine fetuses. Cells were characterized using stem cells antibodies. Differentiation assays as well as karyotype analysis were performed. Teratogenic properties this cells were evaluated. After establishment of primary culture, best proliferation potential was observed in bone marrow progenitor cells. Bone marrow and liver progenitor cells were more efficient in CFU-F assay, then yolk sac progenitor cells. Evidenced by TEM cells with a high nuclear-to-cytoplasmic ratio and cells with cytoplasm rich in organelles. Cells isolated from liver showed epithelial-like morphology and cytoplasm rich in organelles. The yolk sac, liver bone marrow cells reacted positively with nestin and vimentin, being negative to CD45 and CD13 antibodies. Additionally bone marrow progenitor cells were positive to CD44. Bone marrow and liver progenitor cells reacted positively with cytokeratin 18. Yolk sac progenitor cells were positive to ve-cadherin. A few Oct3/4 positive cells were found in yolk sac, liver and bone marrow. Yolk sac and bone marrow progenitor cells showed successful osteogenic, chondrogenic, myogenic differentiation. Differentiation liver progenitor cells were able to bone and muscle cells. The bone marrow progenitor cells were able to produce neuron-like cells. None of progenitor cells showed adipogenic differentiation. The study suggests the presence of mesenchymal-like and epithelial-like progenitor cells. All the karyotype remained and failed to induce the formation of tumors. Stem cells from bone marrow showed high diversity of differentiation than other cell types. It is suggested that these cells are possible candidates for cell therapy.

Key-Words: Bone marrow. Dog. Liver. Progenitor cells. Yolk sac.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS.....	26
3 REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1 Células-tronco isoladas de tecidos fetais	28
3.2 Célula-tronco mesenquimal	29
3.3 Papel hematopoiético das células-tronco mesenquimais	32
3.4 Saco Vitelino.....	34
3.5 Fígado.....	36
3.6 Medula óssea.....	38
3.7 Cão como modelo pré-clínico para terapia celular e obtenção de células-tronco caninas.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Animais utilizados	43
4.2 Cultura primária do fígado e saco vitelino	46
4.3 Coleta e cultivo das células progenitoras da medula óssea de fetos caninos	47
4.3.1 Separação de células Mononucleares da medula óssea através de gradiente de densidade.....	48
4.4 Dissociação enzimática das células aderentes: Repique celular	50
4.5 Expansão celular.....	51
4.6 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento.....	51
4.7 Ensaio de unidade formadora de colônia	52
4.8 Congelamento e Descongelamento Celular.....	52
4.9 Análise Morfológica Microscópica	53
4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão	53
4.11 Imunocitofluorescência	54
4.12 Citometria de fluxo através do método de marcação direta.....	56
4.13 Citometria de fluxo através do método de Marcação indireta.....	57
4.14 Diferenciação osteogênica	59
4.14.1 Coloração de Von Kossa	59
4.15 Diferenciação adipogênica	59
4.15.1 Coloração de Oil Red	60
4.16 Diferenciação condrogênica	60
4.16.1 Azul de Toluidina.....	61
4.16.2 Coloração de Pricrosirius.....	61
4.16.3 Coloração Tricromo de Masson.....	62
4.17 Diferenciação muscular	62
4.18 Diferenciação neuronal.....	63
4.19 Citogenética.....	63
4.20 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do saco vitelino, medula óssea em camundongos NUDE	64
5 RESULTADOS.....	66
5.1 Características morfológicas externas dos fetos caninos	66

CAPITULO I.....	71
RESULTADOS SACO VITELINO.....	71
6 CULTIVO CELULAR	72
6.1. Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 1.....	72
6.2. Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco vitelino, cultivadas nos Meios de Cultivos 2 e 3.....	81
6.3 Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 4.....	86
6.4 Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 5.....	89
6.5 Cariótipo.....	91
6.6 Ensaio de unidade formadora de colônia das células progenitoras do saco vitelino cultivadas em Meio de Cultivo 5.....	92
6.7 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 5.....	94
6.8 Imunocitofluorescência	99
6.9 Potencial de diferenciação das células progenitoras do saco vitelino	103
6.10 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do saco vitelino in vivo	110
CAPITULO II.....	111
RESULTADOS FÍGADO.....	111
7 RESULTADOS.....	112
7.1. Características das células proveniente da cultura primária do fígado fetal cultivadas em Meio de Cultivo 1	112
7.2 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de fígado fetal em Meio de Cultivo 2	118
7.3 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária do fígado em Meio de Cultivo 3.....	121
7.4 Características das células progenitoras provenientes de cultura primária do fígado em Meio de Cultivo 4.....	123
7.5 Cariótipo.....	125
7.6 Ensaio de Unidade formadora de colônia das células progenitoras do fígado cultivadas em Meio de Cultivo 4.....	126
7.7 Microscopia eletrônica de transmissão	128
7.8 Imunocitofluorescência	131
7.9 Potencial de diferenciação das células progenitoras do fígado	135
7.10 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do fígado em camundongos nude	139
CAPITULO III	140
RESULTADOS MEDULA ÓSSEA.....	140
8 RESULTADOS.....	141
8.1 Características das células progenitoras da medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 1	141

8.2 Características das células progenitoras da medula óssea, cultivadas em Meio de Cultivo 2 144

8.3 Características das células progenitoras da medula óssea, cultivadas em Meio de Cultivo 3 146

8.4 Características de células aderentes de medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4 148

8.5 Cariótipo..... 150

8.6 Curva de Crescimento Celular 151

8.7 Ensaio de unidade formadora de colônia 152

8.8 Citometria de fluxo 154

8.9 Microscopia eletrônica de transmissão 156

8.10 Imunocitofluorescência 160

8.11 Potencial de diferenciação das células progenitoras da medula óssea 164

8.12 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras da medula óssea em camundongos nude 173

9 DISCUSSÃO 174

10 CONCLUSÃO 187

Referências 189

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco podem ser classificadas em três categorias de acordo com o período de isolamento durante a ontogênese: embrionária, fetal e adulta. O termo célula-tronco refere-se a células com habilidade em gerar células-filhas com características similares da célula-mãe, bem como diferenciar-se em células especializadas. Exemplos são: as células-tronco hematopoiéticas que originam todas as células-tronco hematopoiéticas, as células-tronco neurais que originam neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (GAGE, 2000) e as células-tronco mesenquimais que se diferenciam em fibroblastos, osteoblastos e adipócitos (HAYNESWORTH et al., 1992). Outra categoria de célula-tronco é a células progenitora. Estas células progenitoras são comprometidas com uma determinada linhagem celular com capacidade de auto-renovação limitada ou ausente, sendo identificadas na medula óssea (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005).

A primeira população de células-tronco foi identificada na medula óssea de camundongos adultos por McCulloch e Till em 1960. Este trabalho pioneiro identificou as características de células-tronco nas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea. (BECKER et al., 1963). Atualmente há um grande número de populações de células-tronco multipotentes isoladas e caracterizadas a partir de tecidos adultos. Neste contexto as células-tronco mesenquimais são mais estudadas na pesquisa com células-tronco, por apresentarem fácil característica de isolamento e cultivo (FRIEDENSTEIN; 1966; CAPLAN, 1991; PITTENGER et al., 1999).

Outro tipo de célula-tronco estudada é a célula-tronco embrionária. Sua primeira descrição ocorreu na metade do século passado, através de estudos que avaliaram os tipos celulares presentes em teratomas de camundongos (KLEINSNITH et al., 1964). Entretanto, a caracterização de linhagens de células-tronco embrionárias de blastocistos ocorreu somente no início dos anos 80. As células-tronco embrionárias são isoladas da massa celular interna de embriões em estágio de blastócito. Estas células, diferentemente do zigoto, perdem a totipotência após sucessivas divisões celulares, sendo, portanto, capazes de originar os tecidos das três camadas germinativas

(ECKFEIDT et al., 2005). Por causa de sua origem, as células-tronco embrionárias são mais versáteis do que a maioria das células-tronco presentes nos tecidos adultos.

As células-tronco fetais são uma fonte alternativa de células-tronco recentemente descoberta e podem ser isoladas a partir do próprio feto e de estruturas extra-fetais de suporte (BOSSOLACO et al., 2006). O sangue de cordão umbilical, cordão umbilical, membrana amniótica, líquido amniótico e placenta são fontes de células-tronco fetais que se destacam neste campo. As células-tronco do sangue de cordão umbilical foram primeiramente utilizadas no transplante medular em 1988 (BROXMEIER et al., 1989). Em muitos países há bancos de células-tronco de cordão umbilical para o tratamento de doenças hematológicas. O principal tipo de célula-tronco isolada dos tecidos fetais é a CTM que possui um potencial de expansão superior as células-tronco derivadas de tecidos adultos e é menos imunogênica, pois não expressa antígeno tipo II de superfície leucócito humano (HLA) (MIAO et al., 2006). Neste contexto, o saco vitelino, fígado e medula óssea são considerados fontes promissoras de células-tronco, por possuírem nichos de células hematopoiéticas e estromais durante o desenvolvimento embrionário e fetal que são pouco explorados.

No entanto a utilização de fetos e tecidos fetais de humanos ainda possui certa limitação. Sendo assim, o cão é uma alternativa para os estudos das células-tronco fetais. Além disso, os cães representam um excelente modelo pré-clínico para o estudo de células-tronco bem como para a terapia celular, pois as manifestações clínicas das doenças e a fisiologia da espécie canina apresentam similaridades com a espécie humana, quando comparada com outros modelos experimentais tradicionais (cobaias, camundongos e ratos). No mais, a obtenção de linhagens de células-tronco e a terapia celular beneficiarão diretamente os cães para o tratamento de doenças da espécie, e poderão ser posteriormente aplicadas em humanos.

Desta forma, o presente trabalho visa analisar os aspectos morfológicos das células-tronco mesenquimais fetais caninas *in vitro*. Estudando os mecanismos de expansão, caracterização, diferenciação e de desenvolvimento das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea.

2 OBJETIVOSErro! Indicador não definido.

Obtenção, cultivo, expansão e caracterização de progenitoras a partir do saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos; e comparação da plasticidade e versatilidade das mesmas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Muitas são as especulações a respeito do conceito de célula-tronco. Parker et al. (2005) descreveram a opinião de diversos autores sobre o tema e concluem que o consenso sobre o assunto é pequeno ou mesmo inexistente.

Classicamente, as células-tronco são definidas com base em três de suas principais características:

- a) capacidade de auto-renovação, ou a habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula mãe;
- b) capacidade de uma única célula de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares;
- c) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (VERFAILLIE, 2002).

Estas características foram demonstradas nas células-tronco hematopoiéticas e nas embrionárias, mas com o avanço da ciência, várias células foram isoladas e conceituadas como células-tronco, mesmo sem apresentar todas estas propriedades, como por exemplo, as células-tronco mesenquimais. Verfaillie (2002) identificou células progenitoras da medula óssea; estas células foram mantidas por mais de 70 passagens, mantiveram telômeros longos em cultura e possuíam potencial para diferenciar em múltiplas linhagens. Fica claro que os conceitos expostos pelo autor são distintos e esbarram em outro conceito importante a ser esclarecido, mesmo que parcialmente: o de célula progenitora ou precursora. Simplificadamente, estas seriam as células comprometidas com uma determinada linhagem celular. Portanto, possuem capacidade de auto-renovação limitada ou ausente e habilidade de se diferenciar apenas em tipos celulares previamente definidos (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005); ou seja, em células especializadas da linhagem celular em questão.

Uma característica das células progenitoras é a expressão da proteína de filamento intermediário nestina. A nestina é abundante nas células progenitoras derivadas do período embrionário, as quais originam linhagens neuroectodermal, endodermal e mesodermal e em células progenitoras neuronais (ANDRESSEN et al.,

2001; WIESE et al., 2004). A expressão da nestina foi também reportada nas células do folículo piloso (LI et al., 2003) e em células de origem fetal como células da medula óssea de fetos humanos (NAGAI et al., 2007).

3.1 Células-tronco isoladas de tecidos fetais

O feto e os tecidos fetais apresentam-se como potencial fonte para a terapia celular, pois a maioria das células fetais prolifera mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células após o nascimento (FINE, 1994).

As células-tronco isoladas da membrana amniótica e de seu fluido são uns dos tipos de células-tronco fetais mais bem caracterizadas, dentre as células-tronco de origem fetal. O fluido contém uma grande variedade de células de origem embrionária e extra-embrionária como: células epitelióides (originadas da pele e urina); células do fluido amniótico (originada da membrana e trofoblasto); células originadas do tecido conectivo fibroso e mais recentemente descoberta, as células-tronco mesenquimais. As células-tronco mesenquimais expressam marcadores embrionários, tais como *Oct-4* e são capazes de diferenciar em adipócitos, osteócitos, oligodendrócitos e células neuronais (IN 'T ANKER et al., 2003).

As células-tronco isoladas da membrana amniótica apresentam similaridade com as células-tronco isoladas do fluido, no entanto estes tecidos são de fácil obtenção, sendo descartados após o parto. Por outro lado, o uso de células ou tecidos obtidos de abortamentos e partos (FLAKE et al., 1997) levam, às vezes, à contaminação da amostra. A biópsia fetal direta ou por via vídeo, é uma alternativa, podendo causar complicações maternas e fetais, tais como trabalho de parto prematuro. Novos métodos de obtenção de células fetais tentam contornar esses problemas. O sangue periférico materno apresenta-se como fonte com menor risco fetal, porém oferece pequena quantidade de células fetais, freqüente contaminação com células maternas e difícil expansão celular (SEKIZAWA, 2003).

Observa-se interesse crescente na utilização das células fetais em engenharia tecidual, para correção de diversos defeitos congênitos (FUCHS et al., 2003). Em 1957, pela primeira vez foi instituído um programa de transplante de medula óssea fetal (THOMAS et al., 1957). Recentemente, ainda que experimentalmente, as células fetais mostraram-se úteis no tratamento de doenças neurológicas (TABBAL et al. 1998), síndrome de Wiskott- Aldrich aplasia e hipoplasia tímica, doenças hematológicas neuroblastoma (WAGNER et al., 1995) e osteogênese imperfeita (GUILLOT et al., 2008) .

Apesar da larga e bem estabelecida utilização do líquido amniótico e de suas células em diagnóstico pré-natal de rotina citogenética e de seu estudo para avaliação da vitalidade fetal (NORMURA, et al., 2001); o conhecimento atual a respeito da origem e propriedades destas células é limitado (VAN ZWIETEN et al., 2005). Neste contexto, há muito a ser investigado sobre as células-tronco destes tecidos fetais, em especial sobre a origem, isolamento, caracterização e plasticidade das células-tronco mesenquimais.

3.2 Célula-tronco mesenquimal

Em geral as células-tronco mesenquimais são definidas a partir de um conjunto de características apresentadas *in vitro*, incluindo a combinação de marcadores fenotípicos e propriedades funcionais de diferenciação.

Este tipo celular foi primeiramente descrito por Friendenstein (1970) como precursores fibroblásticos da medula óssea. A partir daí, Caplan (1991), Prockop et al (1999) e Colter (2000) purificaram, expandiram e caracterizaram células da medula e estas foram definidas pelos autores como células-tronco mesenquimais.

Como proposto pelo Comitê de Células-tronco mesenquimal da Sociedade Internacional de Terapia celular (DOMICINI et al., 2006), as células-tronco mesenquimais humanas são definidas como *CD105*, *CD73*, e *CD90* positivas (expressão em torno de 90%) e negativas para *CD45*, *CD34*, *CD14* ou *CD11b*, *CD79a*

ou *CD19*, e *HLA*. O marcador de superfície celular *Stro-1* é considerado o melhor marcador para células-tronco mesenquimais, porém não é exclusivo para este tipo celular e ainda, sua expressão não é mantida durante sucessivas passagens em cultivo (KOLF et al., 2007). Estudos recentes demonstraram a expressão de antígeno 1 embrionário estágio específico 1 e 2 (SSEA-1 e SSEA-4) nas células-tronco mesenquimais de camundongos (ANJOS-AFONSO et al., 2007; GANG et al., 2007).

As células-tronco mesenquimais podem ser isoladas a partir de vários órgãos do organismo, tais como: medula óssea, (MEIRELLES et al., 2006) tecido adiposo, periósteo, membrana sinovial, fluído sinovial, músculo, derme, dente decíduo, pericitos trabeculares ósseos, cartilagem articular, cordão umbilical, placenta, fígado, baço e timo (BIANCO et al., 2008). Atualmente há três possibilidades para justificar a presença das células-tronco mesenquimais nos mais diferentes tecidos do organismo. A primeira considera que as células-tronco mesenquimais são originadas de um tecido ou órgão específico, sendo liberadas na circulação em situações de injúria tecidual. Neste caso, os processos de isolamento in vitro de células-tronco mesenquimais a partir de sangue periférico são difíceis (MEIRELLES et al., 2006). A segunda possibilidade baseia-se no fato de que as células-tronco mesenquimais possam ser isoladas a partir de diferentes tecidos. As culturas das células mesenquimais apresentam morfologia semelhante aos fibroblastos e são morfológica e fenotipicamente similares entre si (ZUCK et al., 2001). A teoria mais justificável foi recentemente proposta, baseando-se na relação das células-tronco mesenquimais com o nicho perivascular. Esta possibilidade justifica a presença das células-tronco mesenquimais nos mais diferentes tecidos. O isolamento das células-tronco mesenquimais, a partir de vasos sanguíneos e glomérulo favorece esta hipótese (BIANCO et al., 1999, ZUCK et al., 2001).

Uma das características das células-tronco mesenquimais, quando cultivadas em baixa densidade, é a rápida adesão com formação de colônias. Estas são identificadas como unidade formadora de colônia fibroblastoide –CFU-f (do inglês colony forming units-fibroblastic) (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Presume-se que estas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora (DEANS; MOSELEY, 2000). As colônias com mais de 50 células, quando contadas após 10 a 14 dias de cultivo das células mononucleares da medula óssea, são denominadas de unidade formadora de

colônia (TONDREAU et al., 2004). Na literatura, a frequência de CFU-f foi descrita em diversos trabalhos variando entre $3,4 \times 10^{-3}$ a 10^{-6} de células-tronco mesenquimais plaqueadas a partir das células mononucleares da medula óssea (DEANS; MOSELEY, 2000; GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2000; WEXLER et al., 2003; DAZZI et al., 2006).

Após o isolamento in vitro, as células-tronco mesenquimais demonstraram capacidade de se diferenciar em vários tecidos mesodermis quando induzidas após a utilização de meios de cultivos adequados. As células-tronco mesenquimais diferenciam em osteoblastos, adipócitos, condrócitos, tenócitos, células musculares, cardiomiócitos e células do estroma de sustentação da hematopoiese (PITTINGER et al., 1999; CAPLAN et al., 2001). Outros autores demonstraram a capacidade de diferenciar em células neuronais e endoteliais (BARRY 2001).

Em relação à morfologia das células-tronco mesenquimais, a microscopia de luz revela células fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleos eucromáticos, ovais, grandes e centrais e citoplasma abundante. A microscopia eletrônica revela cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de poli-ribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos (TAGAMI et al., 2003). Quando senescentes, as células-tronco mesenquimais são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma enzima β -galactosidade (associada à senescência) (FEHRER et al., 2005). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (DIGIROLAMO et al., 1999).

As células-tronco mesenquimais demonstraram resultados promissores em estudos pré-clínico e clínico, em doenças cardíacas, pulmonares, traumas medulares e no sistema nervoso central e em defeitos ósseos cartilagosos (BEYER et al., 2006; LE BLANK et al., 2006). A utilização de células-tronco mesenquimais na bioengenharia tecidual em associação a biomateriais, também tem demonstrado resultados satisfatórios. Outra característica importante das células-tronco mesenquimais a ser considerada na terapia celular é o efeito parácrino: através da secreção de moléculas bioativas no tecido enxertado. As células-tronco mesenquimais enxertadas possuem

ação benéfica para o organismo através de suas propriedades anti-apoptóticas, angiogênicas e anti-fibrótica entre outras (ZHANG et al., 2007).

As células-tronco mesenquimais foram amplamente caracterizadas, porém há poucas informações sobre a origem destas células. Sugere-se a origem neuroectodermal, a partir de células neuroepiteliais *Sox1* (TAKASHIMA et al., 2007). Outra teoria é que as células-tronco mesenquimais, assim como as células-troncos perivascularres, descendam do mesoangioblasto: células embrionárias localizadas na aorta dorsal (MINASI et al., 2002). Interessantemente, esta região também é responsável por originar células-tronco hematopoiéticas, isto explicaria a inter-relação entre os nichos hematopoiéticos e mesenquimais e o papel das células tronco mesenquimais na hematopoiese.

3.3 Papel hematopoiético das células-tronco mesenquimais

A suposição de que o microambiente estromal pode sustentar a hematopoiese foi primeiramente descrita por Dexter (DEXTER, 1977). Neste sistema, a cultura de células aderentes da medula óssea manteve as células-tronco hematopoiéticas viáveis e hábeis em originar colônias de granulócitos–macrófagos e colônias eritróides.

Na medula óssea as células-tronco mesenquimais são um importante componente do nicho hematopoiético. Embora as células-tronco hematopoiéticas estejam bem caracterizadas, seu nicho é pouco compreendido. Estudos recentes demonstraram a existência de dois tipos de nichos de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, um nicho endosteal e um nicho perivascular (MITSIADIS et al., 2007). As células-tronco mesenquimais, assim como os osteoblastos e fibroblastos, estão principalmente envolvidas com o nicho endosteal, e estão localizadas no endóstio do osso trabecular (WILSON et al., 2007).

O estroma de sustentação da medula óssea é composto por um grupo heterogêneo de células de origem hematopoiética (macrófagos), endotelial (células endoteliais) e mesenquimal (células reticulares adventíciais, fibroblastos, adipócitos e

osteoblastos) e seus respectivos progenitores. Este conjunto de células regula auto-renovação, proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas através de vários mecanismos, incluindo as interações célula-célula e célula-matriz ou a produção da matriz extracelular e dos fatores de crescimento (DEANS; MOSELEY., 2000).

Dentre os diversos tipos de células que compõe o estroma da medula óssea, as células reticulares adventícias são as únicas que apresentam características de pericitos (FUNK et al., 1995). Pericitos são células peri-endoteliais que se localizam no espaço sub-luminal do vaso sanguíneo (HIRSCHI, 1996). Assim como as células-tronco mesenquimais, os pericitos são hábeis em diferenciar em vários tecidos mesenquimais, sendo positivos para o anticorpo CD146 (ZHANG et al., 2003). O termo “células-tronco perivasculares” compreende um *mix* de células-tronco associadas com o compartimento perivascular.

Além da medula óssea, outros órgãos possuem nichos hematopoiéticos em potencial. Destacamos assim os tecidos fetais como saco vitelino, região ventral da aorta, fígado fetal, timo, baço e medula óssea (GUERREIRO et al., 1997; ZANJANI et al., 1993; CLAPP et al., 1995; TAVIAN et al., 1999). Durante o período gestacional é alta a atividade hematopoiética, com intensa proliferação e diferenciação de progenitores hematopoiéticos. A hematopoiese inicial ocorre no saco vitelino sendo transferida através da circulação para fígado, timo, baço e medula óssea. Na medula óssea ocorre a instalação definitiva do nicho hematopoiético e estromal (PEAULT, 1996).

Campagnoli et al. (2001) isolou e caracterizou progenitores mesenquimais do fígado, sangue e medula óssea de fetos humanos. As células progenitoras mesenquimais isoladas do sangue, fígado e medula óssea possuíam morfologia fibroblastóide e eram imunopositivas para marcadores mesenquimais como *CD29*, *CD44*, *SH2*, *SH3* e *SH4* e negativos para hematopoiéticos e endoteliais *CD45*, *CD34*, *CD14*, *vWF*. Estas células foram capazes de diferenciar em tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo. Porém pouco se sabe sobre a atividade hematopoiética destes tecidos fetais e, principalmente, a interação das células-tronco mesenquimais com as células-tronco hematopoiéticas. Sendo assim, tecidos como saco vitelino, fígado e

medula óssea fetal podem ser modelos para o estudo dos nichos hematopoiéticos, pericitos e de células-tronco mesenquimais.

3.4 Saco Vitelino

O saco vitelino em cães é uma membrana fetal, composta morfológicamente por três camadas: uma simples camada de endoderma, um simples mesotélio e, intermediário a eles, o mesênquima vascular. Nesta espécie o saco vitelino persiste até o nascimento, como uma estrutura enrugada e altamente vascularizada (LEE et al., 1983; BJORKMAM et al., 1989) e de grande importância como um mediador de trocas entre a mãe e o embrião (PERRY, 1981; RÜSSE et al, 1992).

Uma das funções do saco vitelino é a atividade hematopoiética. Foi demonstrado que a primeira hematopoiese surge nas ilhas vasculares do saco (FIGURA 1). Acredita-se que as ilhas vasculares sejam originadas a partir dos hemangioblastos, os quais originam células endoteliais e sangue primitivo. (AUERBACH et al.,1998) (Figura 1). Estes precursores hematopoiéticos derivados do saco vitelino são responsáveis por colonizar tecidos fetais (fígado, timo, baço, medula óssea) (MOORE e METCALF, 1970)

Fonte: Michael et al, (2005).

Figura 1- Esquema demonstrativo da estrutura do saco vitelino seus respectivos progenitores endoteliais e hematopoiéticos.

Há evidências de que as células que compõe o saco vitelino dos mamíferos possuam capacidade de diferenciar não somente em eritrócitos nucleados embrionários primitivos, mas também em eritrócitos maduros, linfócitos, células mielóides e células que compõe a linhagem celular sanguínea definitiva (AUERBACH et al., 1998; MEDVINSKY et al., 1993; JAFREDO et al., 2005). Desta forma, há um grande interesse na obtenção de células-troco a partir do saco vitelino a fim de isolar células progenitoras capazes de manter a linhagem hematopoiética *in vitro*.

Trabalhos realizados por Globerson et al. (1987); Liu e Auerbach, (1991a,b) e Godin et al. (1995), identificaram uma população pluripotente de células no saco vitelino capazes de diferenciar em células hematopoiéticas.

Corn et al. (1991) e colaboradores realizaram a injeção de células-tronco isoladas do saco vitelino em camundongos halogênicos. Ao realizar a investigação no baço, timo e medula óssea a fim de identificar anticorpos específicos contra marcadores de células sanguíneas, os resultados confirmaram a capacidade dessas células do saco vitelino em originar células T, B e macrófagos/monócitos maduros. Além da evidência morfológica, foi testada a funcionalidade das células injetadas, sob forma de produção de anticorpos específicos. O soro dos camundongos sofreu diluições seriadas e foi colocado em contato com os dois antígenos, tendo a presença de células competentes na produção de anticorpos funcionais, como os linfócitos B.

A transferência *in vivo* das células-tronco do saco vitelino também foi capaz de repopular o baço de camundongos que tiveram seu sistema hematopoiético previamente destruído por doses letais de radiação. Essa situação se assemelha a pacientes com o sistema linfo-hematopoiético deficiente devido a uma doença genética ou infecção viral adquirida; ou quando o sistema de um paciente é intencionalmente destruído por quimioterapia ou radioterapia para erradicar células tumorais da medula óssea. Ainda, os camundongos tratados com as células-tronco do saco vitelino tiveram um prolongamento da sobrevivência quando comparados aos animais do grupo controle, que não receberam tratamento (CORN et al., 1991; AUERBACH et al., 1996).

O transplante intra-uterino de células do saco vitelino de camundongos em fetos halogênicos e em animais recém-nascidos xenogênicos não induziu reações de

rejeição ao enxerto. As células do saco vitelino persistiram *in vivo* e o receptor passou a apresentar o baço, fígado e sangue periférico quimérico (SURBEK et al., 2001).

Outro tipo de célula-tronco que pode ser isolada *in vitro* a partir do saco vitelino é a CTM. Neste contexto há somente um trabalho, realizado por Wang et al. (2008). As células-tronco mesenquimais isoladas do saco vitelino de humanos possuíam morfologia fibroblastóide e eram hábeis em formar colônias. Estas células eram imunopositivas para marcadores de pluripotência como *OCT-4* e *Nanog* e para os marcadores mesenquimais *CD105 (SH2)*, *CD73 (SH3)*, *CD29*, *CD44*, *CD166*, e *HLA-ABC* e eram negativas para marcadores hematopoiéticos e endoteliais *CD45*, *CD14*, *CD19*, *CD34*, e *CD31*. Ao avaliar o potencial de diferenciação em tecidos mesodermiais, as células-tronco mesenquimais do saco vitelino se diferenciaram somente para osteoblastos e adipócitos. Contudo, o potencial da membrana vitelínica tem muito a ser investigado.

3.5 Fígado

O fígado apresenta significativo papel durante a hematopoiese fetal. Este órgão é responsável por diferenciar os progenitores em células diferenciadas da linhagem hematopoiética durante o desenvolvimento fetal. Na fase hematopoiética, este órgão é rico em células-tronco hematopoiéticas e células eritróides, e com uma menor proporção de linfócitos e granulócitos (DU BOIS, 1963).

Entretanto, o fígado ganhou destaque nas pesquisas com células-tronco pela sua alta capacidade proliferativa e regenerativa através de células hepáticas. (FAUSTO, 1994). Porém a capacidade regenerativa por meio de células maduras altamente diferenciadas (hepatócitos) é limitada (FAUSTO, 1994; GRISHAM; THORGEIRSSON, 1997;). Quando o dano é altamente severo a ponto de afetar a auto-renovação dos hepatócitos, a regeneração torna-se possível somente através da expansão e diferenciação das células-tronco do fígado (KUBOTA e REID, 2000).

As células-tronco hepáticas do fígado localizam-se nos canais de Hering e entre as pequenas ramificações biliares intra-hepáticas, alinhadas com os hepatócitos e com a linhagem de células epiteliais ductulares. Também foi identificado que as células-tronco do fígado localizam-se na zona periductular/intraportal (DABEVA et al., 2003; FAUSTO, 1994).

Fonte: Junqueira Carneiro (2008).

Figura 2 - Aspecto tridimensional do fígado humano.

Durante o desenvolvimento fetal as células-tronco do fígado surgem a partir do hepatoblasto. Esta célula-tronco origina os primitivos ductos biliares intra-hepáticos e os hepatócitos (1997; FAUSTO, 1994). As células hematopoiéticas do fígado fetal possuem origem extra-hepática, sendo provenientes de células-tronco do saco vitelino (WILSON et al., 1963).

Em ratos e humanos os hepatoblastos localizam-se próximos ao espaço porta ou a grandes espaços vasculares (FAUSTO, 1994). Estas células inicialmente são pequenas estruturalmente e assemelham-se funcionalmente a hepatócitos ou células do ducto-biliar (GRISHAM e THORGEIRSSON, 1997). Os hepatoblastos expressam citoqueratinas-7/8/18/19, mas a expressão destas proteínas decresce progressivamente durante a gestação. (SHIOJIRI et al., 1991).

ZVIBEL et al (2006) descreve que além dos hepatoblastos, o fígado fetal contém células-tronco ovais. As células ovais são consideradas uma progênie de células hepáticas (GRISHAM & THORGEIRSSON, 1997). As células ovais desenvolvem-se próximas às células estreladas, sendo ativadas em resposta a processos inflamatórios (DABEVA et al., 2003). Sugere-se que as células ovais residem à medula óssea e posteriormente migram para o fígado, as quais se tornam hepatócitos (ZVIBEL, 2006).

As células ovais ativadas expressam marcadores para células epiteliais biliares (citoqueratinas 7/8/18/19, OV-6, *conexina 43*), marcadores para hepatoblastos fetais (*AFP*, *CGT M2-PK*), marcadores de células-tronco hematopoiéticas (*Thy-1*, *c-kit*, *CD34*) e marcadores específicos de células neuroepiteliais (*N-CAM*) (ALISON, 1996). Fenotipicamente as células ovais assemelham-se aos hepatoblastos fetais (DABEVA et al, 2003).

As células hepáticas estreladas são consideradas o principal tipo de célula mesenquimal do fígado. Estas células localizam-se nos espaços peri-sinusoidais (LOREAL et al., 1992). *In vivo* produzem componentes da matriz extracelular como o colágeno tipo I, III e IV e fibronectina, laminina e proteoglicanas (RAMADORI, 1991). Apresentam várias funções importantes tais como: remodelagem da matriz extracelular; produção de fatores de crescimento e citocinas; contração e dilatação do lúmen sinusoidal (IMAI; SENOO, 1998) e são responsáveis pelo armazenamento de vitamina A (mais de 80% de todo o corpo) (BLOMHOFF et al., 1990). Estas células são consideradas pericitos especializados no fígado. (PINZANI, 1995). Em condições patológicas como fibrose hepática, as células estreladas são ativadas e proliferam rapidamente, perdendo os acúmulos de vitamina A e lipídios. A morfologia das células hepáticas estreladas modifica-se de estrelada para o formato de semelhantes aos fibroblastos ou aos miofibroblastos (IMAI; SENOO, 1998).

3.6 Medula óssea

Diferentemente do que ocorre em outros órgãos, a medula óssea é composta por dois sistemas de células-tronco: o sistema hematopoiético e o sistema estromal

(BIANCO et al., 2006). No entanto, as células progenitoras multipotentes, definidas como células-tronco mesenquimais, ganharam destaque nas pesquisas devido ao seu fácil isolamento *in vitro* e seu potencial de diferenciação em linhagens mesodermas. Estas células já foram bem caracterizadas *in vitro*, sendo demonstrada sua habilidade em diferenciar em osso, cartilagem, músculo, estroma medular, tendão, derme e gordura. Outra característica importante é sua atuação imunomoduladora (CAPLAN, 1991, 2005).

Nos últimos anos as células-tronco mesenquimais da medula óssea têm despertado grande interesse devido ao seu possível potencial de envolvimento no processo de reparo tecidual. Sendo assim, estas células são um dos tipos de células-tronco mais estudados.

Além das células-tronco existentes na medula óssea (células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais), recentemente foi identificada uma rara população de células-tronco não hematopoiéticas com características similares as células-tronco pluripotentes (KUCIA et al., 2005; RATAJCZAK et al., 2007). Esta rara população de células-tronco é hábil em se diferenciar em todas as células das três camadas germinativas. Estas células foram descritas na literatura como células-tronco semelhantes a embrionárias (do inglês *very small embryonic-like stem cells*) (BELTRAMI et al., 2007).

Recentemente, uma população homogênea (0,01% da população de células mononucleares da medula óssea) *Sca-1* e *CD45* negativas foram identificadas na medula óssea de camundongos. Elas expressam marcadores de células-tronco pluripotentes como *SSEA-1*, *Oct-4*, *Nanog*, e *Rex-1* e proteína telomerase (KUCIA et al., 2006). Análises de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que estas células possuem característica de células-tronco embrionárias. Morfologicamente eram pequenas em tamanho (3.6 µm de diâmetro) e apresentavam um grande núcleo eucromático, rodeado por um escasso citoplasma.

As células-tronco semelhantes às embrionárias podem ser isoladas da medula óssea a partir de métodos de *cell sorting*. Porém foi demonstrado que estas células podem ser encontradas circulantes mediante situações de injúrias teciduais, as quais irão facilitar a regeneração do órgão danificado (KUCIA et al., 2006). Sendo assim,

podemos considerar a medula óssea um órgão de reserva de células-tronco pluripotentes aptas a repopular tecidos específicos, bem como restaurar tecidos em casos de injúrias.

Acredita-se que a presença de células semelhantes à célula embrionária na medula óssea é resultado do processo de migração das células germinativas do epiblasto, derivadas das células-tronco pluripotentes durante o desenvolvimento embrionário. As células germinativas encontram na medula óssea um microambiente propício para se instalarem no organismo adulto (RATAJCZAK et al., 2007).

Como demonstrado, as células-tronco foram isoladas dos mais diferentes tipos de tecidos humanos e de outros modelos animais, tais como camundongos e ratos, entre outros. Em relação à obtenção e caracterização das células-tronco a partir da espécie canina, há poucos trabalhos na literatura científica.

3.7 Cão como modelo pré-clínico para terapia celular e obtenção de células-tronco caninas

O modelo animal é utilizado em todos os campos da pesquisa biológica (RUSSEL, 2001). A exploração de outras espécies tem regras e uma ética estabelecida. (RUSSEL, 2001; VIEIRA, 1998) Foi Claude Bernard, por volta de 1865, que em seus estudos de fisiologia lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição humana. Seu trabalho “Introdução ao Estudo da Medicina Experimental” procurou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina. Ele provocou situações físicas e químicas que resultavam em alterações nos animais semelhantes às de doenças em humanos. O autor enfatizava a aplicabilidade da experimentação animal aos humanos (FAGUNDES et al., 2004).

Fagundes et al. (2004) em sua pesquisa bibliográfica verificou-se que o rato e o camundongo são os animais mais freqüentemente utilizados. O coelho, o cão e o suíno seguem a lista nas referências de língua inglesa. Nas bases de dados da literatura

Latino-Americana, o cão supera o número de citações de coelhos e suínos. Os primatas são minoria nas citações em todas as bases de dados. As revisões sistemáticas também têm no rato o maior número de citações, as demais espécies são citadas em igualdade de condições.

Historicamente, o cão é um modelo animal utilizado para os estudos dos mecanismos e tratamentos de diversas patologias, tais como câncer de próstata, doenças cardiovasculares, diabetes, leucemia entre outras. O modelo canino representa um excelente modelo pré-clínico para o estudo de doenças humanas, pois tanto as manifestações clínicas das doenças como a fisiologia da espécie canina apresentam similaridades com a espécie humana quando comparadas com outros modelos experimentais tradicionais (cobaias, camundongos e ratos). Além disso, a coleta de amostras sanguíneas e de outros tecidos, assim como intervenções clínico - cirúrgicas tornam-se facilitadas devido ao grande porte físico do cão, quando comparado com cobaias (KIRKNESS, 2003). Sabe-se que dentre as diversas doenças caninas hereditárias, mais da metade ocorrem de forma similar em humanos, como no caso das cardiomiopatias, câncer de próstata e distrofia muscular entre outras (STARKEY et al., 2005). Além do mais, o cão é a espécie predominantemente utilizada para as pesquisas de transplantes celulares, por apresentar a cinética da célula-tronco e a demanda hematopoiética similares ao organismo humano (HORN et al., 2004).

Desta forma, há um grande interesse no isolamento de células-tronco caninas e sua posterior utilização neste modelo experimental, pois os resultados gerados fornecem informações relevantes para o desenvolvimento de novas terapias, passíveis de serem utilizadas em humanos. Outro ponto importante é o grande crescimento da terapia celular na clínica médica veterinária para o tratamento de diversas doenças caninas.

Dentre os diversos tipos de células-tronco isoladas da espécie canina, as células-tronco embrionárias foram isoladas de blastocistos caninos e apresentaram propriedades similares quanto ao potencial proliferativo e de diferenciação comparadas as células-tronco embrionárias humanas (HATOYA et al., 2006; SCHNEIDNER et al., 2007; HAYES et al., 2008; WILCOX et al., 2009; VAGS et al., 2009;) Estas células expressaram marcadores de pluripotência como *Oct-4* e *SSEA-1* e atividade de

fosfatase alcalina. Em suspensão, estas células formaram corpos embrióides e diferenciaram em vários tipos celulares como neurônios, epitélio, fibroblasto e miocárdio (WILCOX et al., 2009)

A caracterização das células-tronco mesenquimais humanas já está bem estabelecida, no entanto para a espécie canina há muito a ser investigado. Em relação às células-tronco mesenquimais caninas, estas foram isoladas de tecido adiposo e medula óssea. Esses estudos demonstram a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais em linhagens mesodermas (SURTER et al., 2004; WIJEWARDANA et al., 2007; NEUPANE et al., 2008). As células mesenquimais isoladas a partir do tecido adiposo de cães adultos expressaram genes associados à pluripotência (*Oct4*, *nanog* e *Sox2*) e possuíam habilidade em diferenciar em osso, cartilagem e gordura (NEUPANE et al., 2008). Outro tipo de células caracterizadas foram as células progenitoras de fígado de cães adultos. Estas células possuíam morfologia epitelial *in vitro* e expressaram marcadores característicos de hepatócitos (*CYP1A1*, *ALB*, e *KRT18*), de colangiócitos (*LPC*) e de células progenitoras (*AFB*, *CD44*, *PROM1*, *c-KIT*) (ARENDES et al., 2008).

Células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical de cães apresentam morfologia fibroblastoíde com algumas células com amplo citoplasma e imunopositivas para os marcadores mesenquimais *CD29*, *CD44*, *CD90*, *SH2 (CD105)* e *SH3 (CD73)* (ZUCCONI et al., 2009). Estas células apresentam capacidade em diferenciar em linhagens ósseas, cartilaginosa e adipogênica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto proposto foi conduzido após aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1 Animais utilizados

Para a análise das células-tronco mesenquimais fetais do fígado, medula óssea e do saco vitelino foram utilizados 21 úteros de fêmeas grávidas sem raça definida (SRD) oriundas de campanhas de castrações, efetuadas pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de São Paulo. Os úteros grávidos com idades gestacionais variadas (30, 35, 45 e 60 dias); foram coletados através da técnica de ovariosalpingohisterectomia. Para a realização da cirurgia as fêmeas foram sedadas com 0.1mg/kg de acepromazina (Acepran®, Univet, São Paulo, Brasil), 0.5mg/kg xilazina (Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brasil) e 20mg/kg quetamina (Dopolen®, Vetbrands, Jacareí, Brasil).

Todo material coletado foi acondicionado em isopor com gelo e transportado para o Laboratório de Células tronco do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP e para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan. Os úteros foram seccionados cirurgicamente para a retirada dos embriões e ou fetos, o material foi fotografado e mensurado pela técnica preconizada por Evans e Sack (1979) (Figura 3).

O número total de fetos coletados foi 167, sendo que em 43 fetos foi possível a mensuração devido a condição de serem neonatos (Tabela 1). A mensuração foi realizada com auxílio de um paquímetro, da crista nugal até a primeira vértebra sacral, para a obtenção da escala CROW-RUMP (Figura 4B).

A coleta de amostras de tecidos fetais variou conforme a idade gestacional coletada, 88 fetos foram designados para a coleta do saco vitelino; 58 para o fígado e 81 para a coleta do aspirado da medula óssea.

Tabela 1 - Dados relacionados ao número e idade aproximada de fetos caninos – São Paulo, 2006-2009

Número de animais	Número de fetos	Crow-rump	Idades fetais aproximadas	Amostras coletadas
1	9	*****	Neonato	Saco vitelino
2	6	4,00 cm	30 dias	Fígado/ saco vitelino
3	10	*****	Neonato	Saco vitelino
4	6	*****	25 dias	Saco vitelino/fígado
5	8	*****	55 dias	Medula óssea/saco vitelino/ fígado
6	8	2,00 cm	23 dias	Saco vitelino
7	10	*****	60 dias	Fígado/ Saco vitelino/medula óssea/
8		7.8cm	43 dias	Medula óssea
9		6.5cm	40 dias	Medula óssea
10		12,2cm	50 dias	Medula óssea
11	7	*****	Neonato	Saco vitelino
12	5	11,2 cm	47 dias	Medula óssea
13	8	13,5 cm	30 dias	Medula óssea
14	4		30 dias	Fígado e saco vitelino
15	6		30 dias	Fígado e saco vitelino
16	6	6,2 cm	35 dias	Fígado
17	6	5.9 cm	35 dias	Fígado
18	7		45 dias	Saco vitelino
19	10		50 dias	Medula óssea
20	10		55 dias	Medula óssea Saco vitelino
21	11		60 dias	Medula óssea

Fonte: Evans e Sack (1973)

Figura 3 - Gráfico demonstrativo da curva de crescimento de embrião e feto da espécie canina, através da metodologia de *crow-rump*

4.2 Cultura primária do fígado e saco vitelino

As amostras coletadas de tecidos vitelinos e hepáticos foram lavadas com solução de PBS-L. Estas estruturas foram maceradas manualmente (fragmentação mecânica) com auxílio de uma lâmina de bisturi, até a obtenção de um homogeneizado dos fragmentos de tecidos. Em seguida os fragmentos dos tecidos hepáticos e vitelinos foram implantados em placas de cultivo de 30x15mm de diâmetro (corning) e garrafas de cultivo de 25 cm² (corning). Após 48 horas, foi realizada a troca do meio de cultivo e retirada dos fragmentos hepáticos e vitelinos das placas e garrafas de cultivo. As células foram incubadas a uma temperatura de 37,0 °C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Os meios de cultivos utilizados para a expansão de células progenitoras do saco vitelino (tabela 2) e fígado (tabela 3) estão especificados nas tabelas abaixo.

Tabela 2 - Meios de cultivos utilizados para a expansão de células progenitoras do saco vitelino de fetos caninos – São Paulo, 2006-2009

MEIO DE CULTIVO	SFB	SUPLEMENTOS	ANTIBIÓTICOS
1	DMEM-HG (GIBCO)	10% SFB (Cripion)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
2	DMEM-LG LGC-Bio	20% SFB (GIBCO)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
3	DMEM-L (LGC-Bio)	20% SFB (GIBCO)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
4	Alfa-MEM (LGC-Bio)	20% SFB (GIBCO)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
5	Alfa-MEM (LGC-Bio)	1%ANE (Invitrogen) 1% L- glutamina (Sigma)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO.Cat.nº1514016)
	15% SFB-HYCLONEv (LGC Bio)		

Tabela 3 - Meios de cultivos utilizados para a expansão de células progenitoras do fígado fetal canino, São Paulo, 2006- 2009

MEIOS DE CULTIVO		SFB	SUPLMENTOS	ANTIBIÓTICOS
1	DMEM-HG (GIBCO)	10% SFB- (Cripion)		1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
2	DMEM-LG (LGC-Bio)	20% SFB (GIBCO)		1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
3	DMEM-LG (LGC-Bio)	20% SFB- DEFINIDO (GIBCO)	1%ANE (Invitrogen) 1% L- glutamina (Sigma)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
4	Alfa-MEM (LGC-Bio)	15% SFB- HYCLONE (LGC-Bio)	1%ANE (Invitrogen) 1% L- glutamina (Sigma)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)

4.3 Coleta e cultivo das células progenitoras da medula óssea de fetos caninos

Foram realizados dois protocolos para o isolamento das células progenitoras da medula óssea e obtenção de células com morfologia semelhante aos fibroblastos *in vitro*. O primeiro não isolou células mononucleares da medula óssea, enquanto que o segundo promoveu o isolamento de células mononucleares da medula óssea, a partir da metodologia de separação por centrifugação em gradiente de *Ficoll-Hypaque* de densidade 1077 g/mL.

Para o isolamento das células da medula óssea foi realizada primeiramente a coleta de medula óssea (Figura 4), a partir da dissecação do membro pélvico, tomando como base o fêmur, este foi inicialmente desarticulado de sua inserção ao osso coxal com a finalidade de melhor isolamento e exposição. Posteriormente foram retirados a pele e os músculos, as epífises distais e proximais, com auxílio de uma tesoura. Após este procedimento, o canal medular foi lavado com meio de cultivo Alfa-MEM e estreptomicina/penicilina a 1%, utilizando-se uma seringa de 5mL e agulhas 25X7.

A solução obtida através do aspirado da medula foi centrifugada a 1000 rpm, 7 minutos, 20°C e as células foram plaqueadas em placas de cultivo de 30x15mm de diâmetro (corning). As células foram incubadas a uma temperatura de 37,0°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Os meios de cultivo utilizados para avaliar a capacidade de expansão das células aderentes da medula óssea, foram especificados na tabela 4.

4.3.1 Separação de células Mononucleares da medula óssea através de gradiente de densidade

A solução obtida através da coleta do aspirado da medula óssea foi primeiramente diluída em solução salina balanceada pH 7.6. Esta solução foi adicionada lentamente com auxílio de uma pipeta de *pauster*, em um tubo de polipropileno de 15mL previamente preenchido com 6ml Ficoll-Paquetm 1077. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 25 minutos á 1600 *rpm* a 20°C, para a obtenção das células mononucleares. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* e transferido para outro tubo de polipropileno com solução de PBS-L.

As células mononucleares foram submetidas a 3 centrifugações a 1000 rpm, 7 minutos, 20°C, para proporcionar a lavagem celular. O botão celular foi ressuspendido com meio de cultivo e transferido para placas de cultivo de 30x15mm de diâmetro. As placas foram incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Os meios de cultivo utilizados para avaliar a capacidade de expansão das células aderentes da medula óssea foram especificados na tabela 4.

Figura 4- Fotografia demonstrando o procedimento de lavagem do canal medular de fetos caninos com idades gestacionais aproximadas de 55 dias de gestação, com meio de cultivo alfa-MEM, com auxílio de uma seringa de 5ml e agulhas 25X7

Tabela 4 - Meios de cultivos utilizados para a expansão de células progenitoras da medula óssea, São Paulo, 2006-2009

MEIOS DE CULTIVO		SFB	SUPLEMENTOS	ANTIBIÓTICOS
1	DMEM-HG (GIBCO)	10% SFB- (Cripion)		1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
2	Alfa-MEM (LGC-Bio)	15% SFB (GIBCO)		1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
3	DMEM-LG (LGC-Bio)	15 SFB (GIBCO)	1%ANE (Invitrogen)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
			1% L- glutamina (Sigma)	
4	Alfa-MEM (LGC-Bio)	15% SFB- HYCLONE-	1%ANE (Invitrogen)	1%Estreptomicina/Penicilina (GIBCO)
			1% L- glutamina (Sigma)	

4.4 Dissociação enzimática das células aderentes: Repique celular

As células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea, como todas as células que crescem em monocamada, secretam uma matriz extracelular e proteínas de ligação que permitem adesão das mesmas à superfície de crescimento. Por apresentarem esta característica, as células progenitoras precisam ser submetidas ao tratamento prévio com enzima proteolítica como, por exemplo, a *triple* a qual desfaz as ligações intracelulares entre as células e a matriz extracelular.

Primeiramente retira-se o SFB, o cálcio e o magnésio do meio, para permitir o afrouxamento entre as células e a matriz extracelular e facilitar o acesso da enzima as superfícies das células. Desta forma, a dissociação teve início com a retirada do meio de cultivo existente na garrafa de cultivo, estas foram posteriormente lavadas duas vezes com solução de PBS-L, para a retirada de todo o resíduo do meio de cultivo. Em seguida adicionou-se 1 ml de *triple* para garrafas de cultivo T25 permanecendo incubadas por 4 a 5 minutos a 37°C.

Após este período foram adicionados 5ml de meio de cultivo suplementado com SFB, para a inativação da *triple* e toda suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo de polipropileno de 15ml com 5ml de meio de cultivo. Em seguida os tubos foram centrifugados por 1000rpm a 5 minutos.

As células resultantes da centrifugação foram ressuspensas em 1ml de meio de cultura, para a contagem celular em câmara de Neubauer, sendo posteriormente transferidas para garrafa de cultivo. As células foram novamente incubadas sob as mesmas condições de cultivo a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.5 Expansão celular

Após o isolamento das células progenitoras a partir dos fragmentos vitelinos, hepáticos e das células obtidas da medula óssea, o processo de expansão celular foi iniciado para a realização dos ensaios de caracterização morfológica, imunofenotipagem e de diferenciação celular. Alíquotas de 1×10^6 das células progenitoras foram diluídas em 1ml de meio de cultivo, sendo posteriormente transferidas para 2 garrafas de polipropileno de 75 cm² que foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia óptica e o meio trocado de 2 a 3 dias, de acordo com a necessidade da cultura.

4.6 Avaliação do crescimento celular: curva de crescimento

Com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular, realizamos a curva de crescimento. Esta foi avaliada periodicamente com intervalos de 24 horas entre cada repique, a partir do repique inicial, seguindo o cálculo descrito abaixo:

$$\frac{\text{número total de células} \times 10^4 \times \text{volume de meio suspensão}}{\text{número de quadrantes contatos}}$$

Depois de realizada a contagem, as células eram então divididas de tal modo, que todas as garrafas de cultivo T25 continham a mesma quantidade celular inicial X, isto só é possível com a utilização da regra abaixo relacionada:

$$\frac{\text{número total de células} \times 10^5}{\text{número de células desejadas}} = \frac{\text{volume de meio ressuspendido}}{X}$$

Feita a contagem, $2,5 \times 10^5$ das células eram transferidas para as garrafas de cultivo de T25 previamente preenchidas com o meio de cultura e posteriormente

acondicionadas na estufa a 37,0° C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

4.7 Ensaio de unidade formadora de colônia

Para avaliar a capacidade de formar colônia das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea, realizamos o ensaio de CFU-f. Para isto 10³ células em P1 foram plaqueadas em placas de cultivo com área de 90mm de diâmetro (corning). As células foram mantidas por dez dias em cultivo e o meio foi trocado a cada três dias. Após este período as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e coradas com cristal de violeta. O valor considerado para o cálculo da quantificação das CFU-f foi o número total de colônias com mais de 50 células no “10° dia” de cultivo, dividido pelo número total de células progenitoras plaqueadas. Adaptado de Tondreau et al. (2004).

4.8 Congelamento e Descongelamento Celular

Alíquotas de 1x10⁶ células derivadas do saco vitelino, fígado e medula óssea foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células derivadas do saco vitelino, fígado e medula óssea derivadas da digestão através da enzima tripsina á 0,25% foram ressuspendidas em 1,5 ml de meio de congelação e igualmente distribuídos em criotubos (corning).

Após, os criotubos (corning) foram transferidos para o aparelho *Mister Froozen* e mantidas em freezer -80°C *overnight*. Depois 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados. O meio utilizado era composto por 45% de DMEM-H, suplementado com 45% de SFB (GIBCO), 10% de DMSO (LGC-Bio)

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho maria a 37°C. Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos

criotubos (corning) foi transferida para tubos de polipropileno de 15ml com meio de cultivo suplementado com SFB. Em seguida as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo para expansão das células.

4.9 Análise Morfológica Microscópica

A microscopia das células derivadas do cultivo foi fotodocumentada periodicamente, através do microscópio invertido NIKON ECLIPSE TS100. Desta forma, foi acompanhado todo o desenvolvimento morfológico durante o crescimento e proliferação celular em cultura.

4.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Primeiramente as células progenitoras do saco vitelino, fígado e da medula óssea foram fixadas por uma hora em solução de glutaraldeído a 2,5%. Após fixação as células foram lavadas com solução de PBS-L por duas vezes de 5 minutos a 1000rpm e fixadas com ósmio (Polysciences, Inc., USA) a 1% a 4°graus por uma hora. Após este período as células foram submetidas a desidratação em série crescente de alcoóis (50°, 70°, 95°, 100°).

Em seguida a amostra foi submetida a três banhos antes da inclusão, utilizando:

- óxido de propileno por duas vezes de 10 minutos;
- óxido de propileno, adicionado de resina *sppur* na proporção de 1:1 por 3 horas;
- resina *sppur* pura por 5 horas;

Após estes banhos as células foram incluídas em resina *sppur* e incubadas em estufa á 60°C por 72 horas, para a polimerização da resina.

Os cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo Ultracut R, Leica Microsystems, Germany e as imagens foram capturadas no microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268D, FEI Company, The Netherlands; Mega.

4.11 Imunocitofluorescência

Aproximadamente 3×10^5 células provenientes do cultivo celular primário do saco vitelino, fígado e medula óssea foram cultivados em placas de cultivo de 30x15mm (corning) de diâmetro, sob lamínula de vidro. Após 24 horas, todo o meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com solução de PBS-L 2 vezes por 5 minutos cada, para a retirada de todos restos celulares. Posteriormente as células foram fixadas por 20 minutos em solução paraformaldeído a 4%.

As células foram lavadas em solução de TBS com: 20mM Tris-HCl (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR), pH 7,4, 0,15 M, NaCl (Dinâmica Reagent, São Paulo, SP, Brasil), Tween-20 a 0,05% (Sigma) por 2 vezes de 5 minutos para a retirada de todo o paraformaldeído. Em seguida foi adicionado Triton X-100 a 0,1% (Santa Cruz Biotechnology) por 15 minutos.

Para evitar reações inespecíficas foi utilizada solução de BSA a 5% (Sigma) por 30 minutos sendo posteriormente incubadas (*overnight* à 4°C) com anticorpo primário (Quadro 1). Após este período as células foram lavadas com TBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Em seguida as células foram incubadas com anticorpo secundário (Quadro 2) por 40 minutos a temperatura ambiente em câmara escura. As células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes de 5 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após as lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

As aquisições e análises dos resultados foram feitas através do microscópio de fluorescência (Zeiss AXIO Imager.A1, Carl Zeiss, Germany; e Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Japão, ambos utilizando como luz de excitação a lâmpada HBO) e confocal (Zeiss LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Alemanha, utilizando como luz de excitação a lâmpada HBO para o fluorocromo DAPI, laser de excitação 488 nm para FITC). As imagens foram analisadas e tratadas utilizando o programa AxioVision (AxioVs40

Versão 4.7.0.0, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Alemanha), NIS Elements (NIS Elements Versão 3.01, Nikon, Japão) e Zeiss LSM Image Browser (Version 4.2.0.121, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha).

ANTICORPOS	ESPECIES QUE REAGEM	EMPRESA
Oct-3/4 (Sc-5279) Diluição 1:100	HUMANO CAMUNDONGO/RATO	Santa Cruz Biotechnology
Vimentin (Type: V9, sc-6260), diluição 1:500.		Santa Cruz Biotechnology
Cytokeratin ptiptide 18 , (C1399) diluição 1:500.	HUMANO	Sigma
Nestin (ab5922) Diluição: 1:500.	HUMANO	Millipore
Ve-Cadherin (SC-9989) Dilution: 1:500.	HUMANO	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit-LF 32 - Doador por LARRY FISHER Diluição 1:500		Chemicon
Sialoprotein (BSP) AB1854 Diluição 1:500	HUMANO/RATO	Chemicon
alfa-actinin (sarcomeric) (A7811) Diluição 1:500	BOVINO/SUÍNO/COELHO/CAMUNDONGO RATO/ RA/PEIXE/COBRA/GALINHA, CÃO, GATO/OVELHA/HUMANO.	Sigma
CD13 (C8589) Diluição (1:500)	HUMANO	Sigma
CD45 (C7556) Diluição (1:500)	HUMANO	Sigma
Agrecan(MAB 1930)	HUMANO	Chemicon
Colágenoll (MAB8887)	HUMANO	Chemicon

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados para caracterizar as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea através da técnica de imunocitofluorescência - São Paulo - 2006-2009

Anticorpo	Espécie	Empresa
anti-Mouse IgG –FITC conjugated (AP308F) Dilution 1:100	CAMUNDONGO	Amersham Biosciences
Anti-Rabbit IgG-FITC CONJUGATED (AP308F) Dilution 1:100	COELHO	Amersham Biosciences
anti-Goat IgG- FITC CONJUGATED (SC2356) Dilution 1:100	CABRA	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A).

Quadro 2 - Anticorpos secundários utilizados para caracterizar as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea através da técnica de imunocitofluorescência – São Paulo - 2006-2009

4.12 Citometria de fluxo através do método de marcação direta

Primeiramente alíquotas de 1×10^6 de células progenitoras foram lavadas com TBS. Em seguida foi adicionado Triton X-100 a 0,1% por 15 minutos, para permeabilizar a membrana celular. Logo após as células foram novamente centrifugadas por duas vezes a 1000rpm por 5 minutos em solução de TBS. Para bloquear reações inespecíficas as células foram incubadas por 30 minutos com solução de BSA. Em seguida as células foram incubadas com os anticorpos primários conjugado com o anticorpo marcado com o fluorocromo (Tabela 7). Estas amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm e as células foram ressuspensas em 300µl de solução de PBS-L. Finalizado o processamento as células foram analisadas através da citometria de fluxo utilizando o programa WinMDI (Version 2.8, Joseph Trotter, EUA). Os filtros utilizados nos equipamentos acima foram ajustados para a luz de emissão: para os fluorocromos FITC (525 nm) e DAPI (470 nm).

4.13 Citometria de fluxo através do método de Marcação indireta

Neste caso os anticorpos primários (tabela 8) utilizados para a caracterização das células progenitoras da medula óssea não são marcados com o fluorocromo, sendo necessária uma marcação secundária com um anticorpo fluorescente.

Alíquotas de 1×10^6 de células progenitoras foram lavadas com TBS por 2 vezes de 5 minutos. A seguir foi adicionado Triton X-100 a 0,1% por 15 minutos, para permeabilizar a membrana celular. As células foram novamente centrifugadas por duas vezes a 1000rpm por 5 minutos em solução TBS. Após as células foram incubadas com solução de BSA, para bloquear reações inespecíficas por 30 minutos. Em seguida as células progenitoras foram incubadas com os anticorpos primários (Quadro 3). Após as células progenitoras da medula óssea foram incubadas por 40 minutos com os anticorpos secundários (Quadro 4). Estas amostras foram novamente centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 300µl de solução de PBS-L. Finalizado o processamento as células foram analisadas através da citometria de fluxo utilizando o programa WinMDI (Version 2.8, Joseph Trotter, EUA). Os filtros utilizados nos equipamentos acima foram ajustados para a luz de emissão: para os fluorocromos FITC (525 nm) e DAPI (470 nm).

Anticorpo	Espécies que reagem	Empresa
CD31 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD13 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD34 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD44 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD117 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD14 Diluição 1:200	HUMANO	Becton Dickinson.
CD90 Diluição 1:200	CÃO	Veterinary Medical Research & Development
CD29 Diluição 1:200	CÃO	Veterinary Medical Research & Development
CD45 Diluição 1:200	HUMANO	BD Biosciences
HLA classII (CBL 259F) Diluição: 1:200	HUMANO	Chemicon
CD146 (550315) Diluição 1:200	HUMANO	Chemicon

Quadro 3- Anticorpos primários utilizados para a caracterização das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea através da citometria de fluxo – São Paulo-2006-2009

Anticorpo	Espécie	Empresa
anti-Mouse IgG –FITC conjugated (AP308F) - Dilution 1:100	CAMUNDONGO	Amersham Biosciences

Quadro 4 - Anticorpos secundários utilizados para a caracterização das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea através da citometria de fluxo – São Paulo-2006-2009

4.14 Diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação osteogênica 1×10^4 células derivadas da linhagem de células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea foram plaqueadas em de placas de cultivo de 6 poços (corning). Após 24 horas as células foram incubadas com o meio de cultivo osteogênico que era composto por DMEM-L (INVITROGEN), 2% SFB (GIBCO), 1% Penicilina/Streptomicina (GIBCO), 50 μ M 2-fosfato ácido ascórbico (5mM) (SIGMA) e 100mM Dexametasona (SIGMA). Após 10 dias de cultivo o meio osteogênico foi suplementado com 10mM β -glicerol-fosfato (SIGMA). O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias e após 21 dias as células foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% e coradas por VON-KOSSA.

4.14.1 Coloração de Von Kossa

Para a realização da coloração de Von Kossa as células pós-fixadas foram lavadas com solução de PBS-L. Em seguida adicionamos nitrato de prata a 1%, mantendo por 45 minutos exposto a luz UV. Após este procedimento, as células foram lavadas com água destilada. A seguir adicionamos a Safranina a 1% por 5 minutos e após as células foram lavadas com água destilada.

Para a coloração adicionamos o corante Von Gieson (composto de fucsina a 1%, ácido pícrico saturado e água destilada) por 5 minutos. Por ultimo, lavamos as células em álcool 70% e deixamos as células secando a temperatura ambiente, para posterior fotodocumentação em Microscópio Leica.

4.15 Diferenciação adipogênica

Para promover a diferenciação adipogênica 1×10^4 células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea foram plaqueadas em placas de cultivo de 6 poços.

Após 24 horas, as células foram incubadas com o meio de cultivo para a indução adipogênica composto de DMEM-H (LGC-Bio), 2% SFB (GIBCO), 1% Penicilina/Streptomicina (GIBCO), 1µM Dexametasona, 50µM Endometacina (LGC-bio), 500µM IBMX (SIGMA) e 10 µg/ml Insulina (SIGMA). O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias e após 15 dias as células foram coradas pela técnica de Oil RED (Sigma).

4.15.1 Coloração de Oil Red

Após 15 dias as células foram lavadas com solução de PBS-L por três vezes, seguida da fixação com paraformaldeído 4% por 2 horas. As células foram lavadas novamente 3 vezes com PBS-L e coradas com a solução de Oil Red (SIGMA) por 15 minutos.

4.16 Diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica 2×10^6 derivadas da linhagem das células do saco vitelino, fígado e medula óssea foram cultivadas em suspensão em tubos de polipropileno de 15ml por 21 dias.

O meio de cultivo utilizado para induzir a diferenciação condrogênica era composto por DMEM-H (Invitrogen), 6.25 mg/mL insulina, 6.2 mg/mL transferina, 6.25 mg/mL ácido selênio, 5.33 mg/mL ácido linoléico (ITS; Premix, BD Biosciences, San Jose, CA) , 0,1µM Dexametasona, 1mM Piruvato de Sódio, 50µM 2-fosfato ácido ascórbico e 10 ng/ml de TGF-β1 (LGC Biotecnologia, Brasil). O meio de cultivo foi trocado diariamente.

Após 21 dias o tecido foi fixado com solução de paraformaldeído a 4% por 20 minutos, sendo posteriormente incluídas em Paraplast (Media-Paraplast Plus®, Oxford

Lab.,USA). Para isto as células sofreram uma bateria de desidratação em alcoóis crescente 70°, 80°, 90° e 100°, cada um por 15 minutos, seguida pela desidratação com álcool xilol e xilol I e xilol II por 10 minutos cada um, sendo os pequenos tecidos incluídos em parafina a 60°C.

Para avaliação do potencial condrogênico o material foi cortado no micrótomo LEICA, e os cortes 4 - 5 µm foram corados com Azul de Toluidina, Pricosirius e Tricromo de Masson. A imunofluorescência foi realizada com o anticorpo *colágeno tipo II e agregam*, específico para tecido cartilaginoso.

4.16.1 Azul de Toluidina

A bateria de coloração para Azul de Toluidina está descrita abaixo:

XILOL I	3 MINUTOS
XILOL II	3 MINUTOS
ÁLCOOL 100%	3 MINUTOS
ÁLCOOL 90%	3 MINUTOS
ÁLCOOL 70%	3 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	5 MINUTOS
AZUL DE TOLUIDINA	15 MINUTOS
ÁGUA CORRENTE	5 MINUTOS
EOSIA	5 MINUTOS
TIRAR EXCESSO	
ALCOOL 70%	RÁPIDO
ACOOOL 90%	RÁPIDO
ÁICOOL 100%	RÁPIDO
XILOL I	5 MINUTOS
XILOLII	5 MINUTOS

4.16.2 Coloração de Pricosirius

A bateria de coloração para Pricosirius esta descrita abaixo:

XIOL I	5 MINUTOS
XIOL II	5 MINUTOS
ÁLCOOL 100%	5 MINUTOS
ÁLCOOL 90%	5 MINUTOS
ÁLCOOL 70%	5 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	5 MINUTOS
PRICOSIRIUS	45 MINUTOS
ÁGUA CORRENTE	5 MINUTOS
HEMATOXILINA	5 INUTOS
ÁLCOOL	RÁPIDO
ÁLCOOL	RÁPIDO
ÁICOOL	RÁPIDO
XIOL I	5 MINUTOS
XIOL II	5 MINUTOS

4.16.3 Coloração Tricromo de Masson

A bateria de coloração para Tricromo de Masson esta descrita abaixo:

XIOL I	3 MINUTOS
XIOL II	3 MINUTOS
ÁLCOOL 100%	3 MINUTOS
ÁLCOOL 90%	3 MINUTOS
ÁLCOOL 70%	3 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA.	5 MINUTOS
HEMATOXILINA FÉRRICA	5 MINUTOS
ÁGUA CORRENTE	5 MINUTOS
SOLUÇÃO A	10 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	5 MINUTOS
SOLUÇÃO B	5 MINUTOS
SOLUÇÃO C	5 MINUTOS
AGUA DESTILADA	5 MINUTOS
ÁCIDO ACÉTICO	1 MINUTO
ÁGUA DESTILADA	
ÁLCOOL 70%	RÁPIDO
ÁLCOOL 90%	RÁPIDO
ÁICOOL 100%	RÁPIDO
XIOL I	5 MINUTOS
XIOL II	5MINUTOS

4.17 Diferenciação muscular

Para promover a diferenciação muscular 1×10^3 células derivadas da linhagem das células do saco vitelino, fígado e medula óssea foram cultivadas em placas de

30x15mm de diâmetro por 15 dias. O meio de diferenciação muscular era composto por DMEM-H (LGC-bio), 5% soro de cavalo e SFB e 50 Mm de dexametasona (Invitrogen).

Após 15 dias as células foram lavadas com solução de PBS-L por três vezes, seguida da fixação com paraformaldeído 4% por 2 horas. As células pós-fixadas foram submetidas a técnica de imunocitofluorescência com o anticorpo para célula muscular *Alfa-actinin sarcomeric*.

4.18 Diferenciação neuronal

A diferenciação neuronal foi realizada somente nas células progenitoras da medula óssea fetal. Para isto 1×10^4 células foram plaqueadas em placas de 6 poços (corning), estas células foram cultivadas por 10 dias com o meio de diferenciação neuronal. O meio era composto por Meio Neurobasal (GIBCO) e suplemento B27. Após 15 dias as células foram lavadas com solução de PBS-L por três vezes, seguida da fixação com paraformaldeído 4% por 2 horas. As células pós-fixadas foram coradas pela técnica rotineira de Hematoxilina-Eosina.

4.19 Citogenética

O protocolo de citogenética é dividido em três etapas. A primeira etapa baseia-se no preparo das células em cultura (obtenção de metáfases); a segunda é a fixação das células e a terceira é a confecção de lâminas com avaliação das metáfases e procedimentos de colorações.

A primeira etapa é crucial, onde é necessário um grande número de metáfases. Para isto, fatores de crescimento que estimulem a proliferação celular e conseqüentemente o número de metáfases foram utilizados. Utilizou-se 1% do

suplemento AMNIOMAX (GIBCO) por 24 horas, para estimular o crescimento celular. Os cromossomos da espécie canina têm tamanho reduzido e por isso foi utilizado Brometo de Etídio para alongar os cromossomos, na concentração final de 1,5 µg/ml por 3,5 horas. Em seguida para interromper o ciclo celular foi utilizado Colcemid (Invitrogen) na concentração final 0,02µg/ml por 1,5 horas. Após este período, foi iniciada a coleta das células em estágio de metáfase, com auxílio de tripsina 0,12%. Após 3 a 5 minutos as células foram coletadas e centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. Em seguida células foram incubadas por 30 minutos com solução hipotônica (KCl 0,075M) em estufa a 37°C a fim de sensibilizar a membrana celular.

Após este procedimento, a etapa de fixação das células foi iniciada com a utilização de metanol e ácido acético na proporção 3:1, adicionando 10 gotas deste fixador na suspensão celular. Em seguida, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 1000rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Em seguida foi adicionado 2 ml do mesmo fixador gelado e armazenou-se a -20°C.

A próxima etapa do protocolo de citogenética é a confecção de lâminas para avaliar a qualidade dos cromossomos. Para promover a limpeza das lâminas, estas foram mergulhadas na solução sulfocrômica (K₂Cr₂O₇ e H₂O) por 1 hora, sendo posteriormente lavadas em água corrente e água destilada. Após, a suspensão foi gotejada na lâmina e seca a temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com Giemsa por 5 minutos. Em seguida as metáfases foram fotodocumentadas com auxílio do microscópio de luz

4.20 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do saco vitelino, medula óssea em camundongos NUDE

Após a caracterização *in vitro* das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea, foi avaliado o potencial teratogênico em camundongos nude. Para isto 1x10⁶ células foram aplicadas via intramuscular no membro torácico direito dos

camundongos nude. Primeiramente as células provenientes da técnica de repique celular foram centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm com PBS-L para retirada dos resíduos de meio de cultivo. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 30ul de solução fisiológica e aplicadas na pata do camundongo nude, com auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante quatro semanas e uma vez por semana verificou-se se haveria formação tumoral.

5 RESULTADOS

5.1 Características morfológicas externas dos fetos caninos

A descrição morfológica dos embriões e dos fetos foi realizada para estimar suas idades embrionárias e fetais.

O material com de 25 dias de gestação, não apresentava nenhuma característica da espécie canina. Este possui características primitivas, sendo semelhante a embriões das demais espécies de mamíferos domésticos, evidenciando o formato de “C” embrionário e a presença dos brotos dos membros torácicos e pélvicos. As membranas fetais são facilmente visualizadas, especialmente o saco vitelino, o qual se encontrava ventralmente ao feto sendo bastante amplo e chegam a atingir três vezes o tamanho embrionário (Figura 5A).

Com 30 dias de gestação os fetos apresentam os brotos torácicos e pélvicos, com característica de membro verdadeiro. A orelha e a cauda encontram-se formadas, apresentando uma aparência característica da espécie canina. O saco vitelino é reduzido em volume (Figura 5B).

Aos 40 dias de gestação tanto o feto quanto as membranas fetais apresentam um aumento significativo de tamanho, bem demonstrado pela membrana corioalantoíde (Figura 6A). Externamente nesta fase há uma semelhança característica da espécie canina; os membros, os dígitos e o tegumento estão completamente formados (Figura 6B); o fígado continua sendo o maior órgão, ocupando quase toda a cavidade abdominal do feto (Figura 6C).

No período referente aos 50 dias de gestação foram encontradas diferenças significativas, comparadas aos 40 dias de gestação. Os fetos continuaram o processo de desenvolvimento, adquirindo poucos centímetros de comprimento e o saco vitelino apresentava-se ainda bem evidente (Figura 7B). Entretanto nesta fase o conceito

ocupava quase todo o saco gestacional, diferentemente ao verificado aos 40 dias de gestação (Figura 7A).

A partir de 50 dias de gestação os fetos já apresentavam o fêmur e o úmero com características de ossos longos, demonstrando epífises, diafases, metáfases (Figura 7C) e o canal medular. Aos 60 dias de gestação os fetos aumentam de tamanho significativamente e ocupam todo o saco gestacional (Figura 8A), sendo marcado pela presença de pêlos acompanhados de diminuição do saco vitelino (Figura 8B).

Figura 5 - Esta imagem demonstra a rápida transição do embrião para o feto na espécie canina. Em A o embrião com 25 dias de gestação, com formato de “C”. Observar os brotos (seta vermelha) e a seta preta aponta o saco vitelino sendo três vezes maior que o feto. Em B o feto com 30 dias de gestação no saco gestacional

Figura 6- Concepto com idade aproximada de 40 dias de gestação. Em (A) a placenta e o grande saco coriolantoideano (SC). Em (B) a seta vermelha aponta para o saco vitelino. Observar que os membros e as garras (círculo) estão completamente formados. Em (C) demonstra-se o fígado de caninos (seta amarela)

Figura 7- Esta imagem demonstra fetos com idades aproximadas de 50 dias de gestação. Em (A) o conceito envolto pela membrana corioalantoideana, em (B) o saco vitelino (seta) e em (C) o fêmur extraído do feto através dissecção: epífises proximais (Ep), epífises distais (Ed) e a metáfase (Mt)

Figura 8 - Feto de termo coletado a partir de uma castração. Em (A) o feto envolto pela grande membrana corio-alantoideana. Em B o feto livre dos anexos fetais. Observar que nesta fase o mesmo encontra-se completamente desenvolvido, totalmente recoberto por pelos; a seta amarela aponta o saco vitelino. Demonstra-se também a aferição do comprimento da crista nuchal a última vértebra sacral, realizada com auxílio do paquímetro para a obtenção da escala *crow-rump* (seta preta)

CAPÍTULO I
RESULTADOS SACO VITELINO

6 CULTIVO CELULAR

Foram utilizados cinco meios de cultivo para o isolamento e expansão das células- tronco progenitoras do saco vitelino.

6.1. Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 1

Inicialmente o cultivo de saco vitelino de 25 e 60 dias de gestação era composto por inúmeras células flutuantes indiferenciadas com formato circular, muitas foram encontradas sob forma de grupos celulares. (Figura 9A –C e Figura 14 A, B, C e D). Após os cinco primeiros dias de cultura, o meio de cultivo foi desprezado juntamente com as células flutuantes, restando somente células que possuíam capacidade de adesão ao substrato (Figura 10A, B, C e D).

Dentre os diferentes tipos celulares liberados em cultura pelo fragmento do saco vitelino com 25 e 30 dias de gestação, foram encontradas células com características semelhantes a fibroblastos (Figura 10 A, B, C, Figura 11 A, B, Figura 12 A, B, C e Figura 16 A, B) e células semelhantes à célula epitelial (Figura 11C e 13A). Morfologicamente as células semelhantes a fibroblasto eram heterogêneas fenotipicamente. No início, eram pequenas com formato alongado, fusiforme e citoplasma reduzido, enquanto que outras células apresentavam grandes prolongamentos citoplasmáticos (Figura 10 A, B, C, Figura 11 A, B, Figura 12 A, B, C e Figura 16 A, B).

As células semelhantes às células epiteliais eram grandes e arredondadas, com membrana citoplasmática regular, citoplasma grande e esparso, núcleo circular pequeno sendo uni ou binucleada. Grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo também foram evidenciados (Figura 13 A e B e Figura 11A).

Foi observado que as células provenientes do fragmento do saco vitelino com 30 dias de gestação adquirem características de células diferenciadas após os repiques celulares (Figura 13C e D).

Para saco vitelino com 60 dias de gestação observam-se células, semelhantes a fibroblasto (15A e B). Células de saco vitelino com 60 dias de gestação diferenciam espontaneamente *in vitro*. Foram observadas células com aparência morfológica de células de musculatura lisa, as células que foram isoladas do saco vitelino apresentaram alongadas e dispostas paralelamente na placa de cultivo (Figura 15C e D).

Figura 9- Fotomicrografia de células derivadas do fragmento do Saco Vitelino com 25 dias de gestação cultivados em Meio de Cultivo 1 após 48 horas de cultivo. Demonstra-se a grande quantidade de células liberadas pelo fragmento do tecido em cultivo (A). Observar em B e C aglomerados de células (seta preta e vermelha). Barra= A, B, C 50µm

Figura 10- Fotomicrografia de células progenitoras semelhante a fibroblasto derivadas do fragmento do Saco Vitelino com 25 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 1 com 7 dias de cultivo. Evidenciando a heterogeneidade das células semelhante a fibroblasto provenientes do fragmento do saco vitelino (A, B, C e D). Em B e D células irregulares com projeções citoplasmáticas (seta preta) e células fusiformes (seta branca). Em C observar a intensidade de células liberadas pelo fragmento do tecido em cultivo (*). Barra= A, B, C e D 50μm

Figura 11- Fotomicrografia das duas populações celulares derivadas do fragmento do saco Vitelino com 25 dias de gestação, expandidas em Meio de Cultivo 1. Em A o fragmento vitelino (*) liberando células com morfologia semelhante a fibroblastos (seta preta) e à célula epitelial. Em B colônia de células semelhante a fibroblasto (seta preta). Em C colônia de células semelhantes às células epiteliais (seta vermelha). Barra = A, B e C 25 μ m

Figura 12 - Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento do saco vitelino com 30 dias de gestação expandidas em Meio de Cultivo 1, com 8 de dias de cultivo. Em A e C estão evidenciadas células com morfologia semelhante a fibroblastos bem fusiforme (fusiforme) liberadas pelo fragmento (círculo). Em B observar as células semelhantes a fibroblasto com prolongamentos citoplasmáticos (seta branca). Barra= A 50 μ m, B e C-25 μ m

Figura 13- Fotomicrografia da diferença morfológica das células progenitoras durante o início do cultivo celular e após sucessivas passagens derivadas do cultivo do fragmento do saco vitelino com 30 dias de gestação, expandidas em Meio de Cultivo 1. Em A, células com morfologia semelhante às células epiteliais, apresentam o citoplasma esparso e núcleo reduzido (seta amarela) e em B células com morfologia semelhante a fibroblasto (seta preta). Demonstramos em C e D células com morfologia semelhante a fibroblasto após repique com. Barra= A, B, C e D 50 μ m

Figura 14 - Fotomicrografia do cultivo do saco vitelino 60 dias de gestação com 3 dias cultivo, observar a grande quantidade de células não aderentes e a presença de células com morfologia semelhante a fibroblastos, expandidas em Meio de Cultivo 1. Em A, fragmento do saco vitelino (*) liberando as células. Em B e E, resalta-se células não aderentes (setas brancas) e em D um agrupamento de células semelhantes às células hematopoiéticas (círculo). A figura C células aderentes com morfologia semelhante a fibroblasto após 48 horas de cultivo (seta preta). Barra = A, B, C, D e E 50µm

Figura 15- Fotomicrografia das células progenitoras com morfologia fibroblastoídes do Saco Vitelino (60 dias de gestação) e células com morfologia semelhante a células musculares (com 30 dias de gestação), expandidas com Meio de Cultivo 1. Em A e B células com característica semelhante a fibroblasto. E em C e D células diferenciadas com característica de células musculares. Em C observa-se às células orientadas paralelamente na placa de cultivo. Em D, verificar a fusão celular entre as células com característica muscular (seta). Barra= A, C 50 μm , B e D 25 μm

6.2. Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco vitelino, cultivadas nos Meios de Cultivos 2 e 3

Através da observação morfológica da cultura *in vitro*, de saco vitelino com 30 e 35 dias de gestação, foram identificados dois tipos celulares. Foram verificadas células com morfologia semelhante à célula fibroblastoíde e epitelial (Figura 16A, B, C e D; Figura 18 A, B, C e D), quando cultivadas com o Meio de Cultivo 2 e Meio de Cultivo 3, semelhante a resultados descritos para cultivo celular em Meio de Cultivo 1 (Figura 13 A, B, C).

Morfolologicamente as células semelhantes a fibroblasto eram heterogêneas, geralmente fusiformes e possuíam o núcleo reduzido (Figuras 16B e D; Figura 17A e B; Figura 19 B, C e D). As células semelhantes às células epiteliais eram grandes, arredondadas, possuíam amplo citoplasma e núcleo circular pequeno (Figura 16A e C; Figura 18 A, B, C e D; Figura 19A). Ao atingirem a confluência de 70% as células foram repicadas, e adquiriram morfologia de células grandes com projeções citoplasmáticas (Figura 19 C e D).

Figura 16 - Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do Saco Vitelino com 35 dias de gestação expandidos em Meio de Cultivo 2. Em A e C células com semelhante à célula epitelial (seta preta) com 18 dias de cultivo enquanto que em B e D células semelhantes a fibroblasto (seta vermelha). Em um maior aumento resalta a morfologia destes dois tipos celulares em C célula epitelial apresenta pequena proporção do núcleo (seta amarela) comparado ao citoplasma (seta preta); Em D células semelhantes a fibroblasto com formato fusiforme e citoplasma reduzido (seta vermelha). Barra= A e B 50 μ m, C e D 25 μ m

Figura 17- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento do Saco Vitelino com 35 dias de gestação cultivados em Meio de Cultivo 2. Em A e B células semelhante a fibroblasto (seta preta) com 25 dias de cultivo. Barra= A 50µm, B 25µm

Figura 18- Fotomicrografia das células progenitoras do fragmento do Saco Vitelino com 30 dias de gestação cultivados em meio de Cultivo 3. Em A e B células semelhante a fibroblasto (seta preta) enquanto que em C e D células semelhantes às células epiteliais (seta vermelha). (*= fragmento vitelino) Barra= A, B, C e D 50 μ m

Figura 19- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento do Saco Vitelino com 30 dias de gestação mantidas em Meio de Cultivo 3. Esta figura ressalta a heterogeneidade morfológica das células provenientes do da cultura primária do saco vitelino, após o primeiro repique celular em A, B. Na seta vermelha células semelhantes a fibroblasto e na seta preta células semelhantes às células epiteliais. Em C e D verificar a morfologia diferenciada adquirida pelas células vitelínicas mantidas por longo período em cultivo (seta preta) em Barra=A, B, C50 μ m e D20 μ m

6.3 Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 4

Como relatado anteriormente após 48 horas de cultivo as células não-aderentes foram descartadas juntamente com o meio de cultivo, mantendo somente as células aderentes.

Com 45 e 60 dias de gestação, ao utilizar o Meio de Cultivo 4 foram obtidas células com morfologia semelhante a fibroblasto e a células epiteliais (Figura 20 A e B, Figura 21 A, B e C). Ao contrário dos cultivos celulares mantidos nos Meios de Cultivos 1,2 e 3 neste caso havia maior incidência de células com morfologia epitelial do que fibroblastoídes (Figura 21 A, B e C). Quanto à morfologia, ambos os tipos celulares eram similares aos descritos nos resultados do cultivo celular mantidos em Meio de Cultivo 1 (Figura 11 A e B, Figura 12 A e C).

As células com aparência epitelial eram grandes arredondadas e possuíam citoplasma grande e núcleos circulares, sendo em muitas vezes polinucleadas (Figura 21 A e B). Morfologicamente as células fibroblastoídes eram heterogêneas, variando de formato fusiforme a células com grandes prolongamentos citoplasmáticos e citoplasma esparso (Figura 20B,). Colônias com formato irregulares compostas de tipos celulares heterogêneos morfologicamente (células fusiformes e células epiteliais), também foram encontrados neste cultivo celular (Figura 21 A e B). Estas células mantidas por um longo período em cultura modificaram-se morfolologicamente e tornaram-se grandes com muitas projeções citoplasmáticas (Figura 21D).

Figura 20 - Fotomicrografia da diversidade morfológica das células progenitoras derivadas do fragmento do Saco vitelino com 45 dias de gestação cultivados em Meio de Cultivo 4. Em A e B células com 5 dias de cultivo, verificar o fragmento vitelínico (*) liberando células com morfologia semelhante à célula epitelial (seta). Apresenta o núcleo circular e grande citoplasma. Enquanto que em C e D colônia de células com heterogêneas morfológicamente: células maiores e na seta amarela, célula com morfologia fusiforme justapostas. A seta preta aponta à intensa granulosidade citoplasmática e a seta vermelha o núcleo circular pequeno. Barra= A 50 μ m. B 25 μ m

Figura 21- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento do Saco Vitelino com 60 dias de gestação cultivados em Meio de Cultivo 4. Em A, B e C células com morfologia semelhante à célula epitelial com 15 dias de cultivo, verificar a presença de dois, três (seta preta) e até quatro núcleos (seta vermelha) apresentados por esse tipo celular. Em D células com morfologia semelhante a fibroblastos (seta preta), sendo liberadas pelo fragmento vitelino Barra= A , C e D 50µm, B 25µm

6.4 Características de células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 5

Para as células de saco vitelino, expandidas em Meio de Cultivo, foram obtidas células com morfologia semelhante a fibroblasto. Durante as primeiras passagens (p0 p4) as células eram pequenas, de formato fusiforme. Neste estágio as células semelhantes a fibroblasto possuem um discreto citoplasma. No entanto à medida que eram digeridas pela enzima tripsina nota-se um aumento do volume celular, bem como no citoplasma e prolongamentos citoplasmáticos (Figura 22 A e B). As células aderentes do saco vitelino tiveram crescimento rápido *in vitro*, quando comparada com os demais meios de cultivo.

Figura 22- Fotomicrografia das células progenitoras do Saco Vitelino com 30 dias de gestação cultivados em Meio de Cultivo 5. Em A e B a morfologia semelhante a fibroblasto das células do saco vitelino na quarta passagem de cultivo

6.5 Cariótipo

As células progenitoras isoladas do fragmento do saco vitelino com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 5, na sexta passagem, demonstraram número normal de cromossomos ($2n=76$) (Figura 23).

FIGURA 23- Fotomicrografia da metáfase com número normal de cromossomos ($2n=76$) das células progenitoras do saco vitelino com 30 dias de gestação. As células mantiveram o número normal de cromossomos durante sucessivas passagens *in vitro*. Corados por Giemsa. Barra= 100 μ m

6.6 Ensaio de unidade formadora de colônia das células progenitoras do saco vitelino cultivadas em Meio de Cultivo 5

Após 10 dias do plaqueamento com 10^3 células em placas de cultivo de 90mm de diâmetro propiciou a formação de 5 colônias (5 colônias/ 10^3 células plaqueadas) (Figura 24 A). As colônias eram heterogêneas quanto o diâmetro, sendo raras colônias com alta densidade celular (mais de 50 células). As células das colônias com alta densidade celular eram homogêneas morfolologicamente e apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos. Neste caso, havia uma alta densidade celular propiciando a sobreposição entre as células (Figura 24B). Predominante havia células organizadas sob forma de colônias com baixa densidade celular, composta por células heterogêneas morfolologicamente. As células possuíam aspecto estrelado eram grandes, com citoplasma esparso e núcleo celular pequeno, característica sugestiva de células diferenciadas (Figura 24C).

Figura 24 - Fotomicrografia do Ensaio de Unidade Formadora de Colônia das células progenitoras do saco vitelino em P1 cultivadas com o Meio de Cultivo 5, após 10 dias de cultivo. Em A colônias obtidas a partir de 10^3 células plaqueadas em placas de cultivo de 90mm de diâmetro. Em B colônia com alta densidade celular (seta) e em C células organizadas sob forma de colônias com características de células diferenciadas. Coradas com Cristal de Violeta. Barra B e C= 100µm

6.7 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de Saco Vitelino, cultivadas em Meio de Cultivo 5

As células progenitoras derivadas do fragmento do saco vitelino expandidas *in vitro* em Meio de Cultivo 5, ao serem analisadas morfolologicamente através da microscopia eletrônica de transmissão, revelaram uma população celular, composta por células com morfologia semelhante a células embrionárias (Figura 25 A e B) e mesenquimal (Figura 26 A, B e C e 28B).

Em menor número foram identificadas células com morfologia semelhante à célula embrionária. Estas células morfolologicamente apresentavam alta proporção núcleo citoplasma: (núcleo era grande e citoplasma escasso). O núcleo eucromático era circular em formato, localizando-se centralmente no citoplasma. Na membrana citoplasmática identificam-se finos e escassos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 25 A e B).

As células com morfologia semelhante à célula mesenquimal eram predominantes quanto ao número. Estas células variam quanto ao tamanho e principalmente quanto à proporção núcleo citoplasma. Morfolologicamente possuem o citoplasma mais amplo quando comparadas com as células com morfologia embrionária. Em geral o citoplasma deste tipo celular era granuloso, conferido pela presença de organelas citoplasmáticas (Figura 26 A, B e C). No citoplasma das células mesenquimais, foram observadas mitocôndrias e aparato de Golgi e vacúolos de nitrogênio (Figura 27). As extensões citoplasmáticas eram proeminentes em toda a extensão celular. O núcleo variava em formato de circular a oval, com irregularidades na membrana nuclear (Figuras 26 A, B e C).

Figura 25 - Eletromicrografia de Transmissão de células progenitoras derivadas do cultivo células do saco vitelino com 30 dias de gestação com morfologia semelhante à célula embrionária, cultivadas em Meio de Cultivo 5. Observar a alta proporção núcleo (N) citoplasma (Ct) da célula com morfologia semelhante à célula embrionária em A e B. Em A célula com o núcleo circular (N) e em B célula com núcleo oval. Ressalta-se o escasso citoplasma e a discreta granulosidade citoplasmática (Ct) em A e B. A seta identifica os discretos prolongamentos citoplasmáticos glicogênio. Nu= nucléolo (Aumento=4400vezes)

Figura 26 - Eletromicrografia de Transmissão das células com morfologia mesenquimal derivadas do cultivo células do saco vitelino com 30 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 5. Observar o núcleo lateralizado (N) e o amplo citoplasma (Ct) em A B e C. As células com morfologia semelhante à célula mesenquimal possuem núcleo oval de formato irregular (N), com amplo nucléolo circular (Nu). Estas células possuem uma grande quantidade de prolongamentos citoplasmáticos (seta). (Aumento=4400vezes)

Figura 27 - Eletromicrografia de Transmissão das organelas citoplasmáticas das células com morfologia semelhantes às células mesenquimais derivadas do cultivo células do saco vitelino com 30 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 5. (M= mitocôndrias, seta= Aparato de Golgi, N= vacúolo de nitrogênio. (Aumento=A-2800/B7600 vezes)

Figura 28 - Eletromicrografia de Transmissão de células derivadas do cultivo células do saco vitelino com 30 dias de gestação verificar a grande diferença em relação à proporção núcleo-citoplasma das células com morfologia semelhante à célula embrionária e mesenquimal, cultivadas em Meio de Cultivo 5. Em A célula com morfologia embrionária e em B célula com morfologia mesenquimal Núcleo= N, Nucléolo (Nu) e Citoplasma (Ct) (Aumento=A-2800/B7600 vezes)

6.8 Imunocitofluorescência

O imunofenótipo das células progenitoras do saco vitelino com 30 dias de gestação foi realizado através dos ensaios de imunofluorescência com os anticorpos monoclonais Oct-3/4 (fator de transcrição nuclear), Ve-caderina (anticorpo de célula progenitora endotelial) e marcadores citoplasmáticos de proteínas de filamento intermediário como: vimentina (característico de células mesenquimais e fibroblastos), nestina (característico de células progenitoras neuronal) e citoqueratina (característico de células epiteliais) e anticorpos hematopoiéticos CD13 e CD45.

A imunopositividade para o anticorpo Oct-3/4 foi observada na linhagem das células do saco vitelino cultivadas em Meio de Cultivo 2, em células com morfologia semelhante a fibroblasto (Figura 29 A), morfologia semelhante à célula epitelial (Figura 29 B, C, D). A imunolocalização do Oct-3/4 ocorreu de duas formas: na região perinuclear (Figura 29C) e simultaneamente na região perinuclear e citoplasmática (Figura 29A, B e D).

A linhagem de células derivadas do saco vitelino com morfologia semelhante a fibroblasto cultivadas em Meio de Cultivo 5 demonstram o citoplasma e citoesqueleto celular imunopositivos para os anticorpos vimentina (Figura 30 A e B) nestina (Figura 30C) e Ve-caderina (Figura 31A e B). No entanto as células progenitoras do saco vitelino cultivadas em Meio de Cultivo 5 foram negativas para citoqueratina-18 (Figura 26C), e marcadores hematopoiéticos CD13 e CD45 (Figura 32 A e B).

Figura 29- Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo OCT-3/4 das células do saco vitelino com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 2. com as diferentes imunolocalizações do anticorpo. Em A, B e D a imunopositividade localizada na região perinuclear e citoplasmática das células com morfologia semelhante à fibroblasto (A) e à célula epitelial (B e D) (seta amarela). Em C célula imunopositividade do anticorpo na região peri-citoplasmática da células com morfologia semelhante à célula epitelial (seta amarela). Em B na seta vermelha controle negativo. Ct= citoplasma, Rpnu= região perinuclear, Nu= núcleo (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-goat)

Figura 30 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência dos diferentes tipos de proteínas de filamento intermediário presentes nas células progenitoras do saco vitelino com 30 dias de gestação cultivadas em Meios de Cultivos 2 e 7. Está demonstrada alta imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da medula óssea para o anticorpo vimentina em A e B e nestina em C (seta branca). Seta amarela= células negativas, azul= núcleo marcado com DAPI, Ct= citoplasma e Nu=núcleo (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse para vimentina e secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit para nestina)

Figura 31 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo VE-caderina das células do saco vitelino com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 5. Está demonstrada a imunopositividade para o anticorpo VE-caderina no citoplasma das células com morfologia semelhante a fibroblastos (seta branca) (A e B). Na seta amarela células negativas. (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse)

Figura 32 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência das células progenitoras do saco vitelino negativas para os anticorpos CD45, CD13 e citoqueratina-18 das com 30 dias de gestação isoladas em Meio de Cultivo 5. Verificar ausência de imunofluorescência das células progenitoras do saco vitelino perante a reação de imunocitofluorescência para os anticorpos hematopoiéticos CD45 (A), CD13 (B) e epitelial citoqueratina18 (C). Azul= núcleo corado com DAPI

6.9 Potencial de diferenciação das células progenitoras do saco vitelino

As células progenitoras do saco vitelino com 30 dias de gestação na quinta passagem isoladas em Meio de Cultivo 5 foram capazes de diferenciar em tecidos ósseos, cartilaginosos e musculares, em cultura com meios de cultivos específicos.

A diferenciação osteogênica foi mantida por 21 dias e após este período foi observado a formação de matriz extracelular. As células progenitoras inicialmente continham morfologia fibroblastoíde e após a indução com o meio de diferenciação osteogênico (após 9 dias de cultivo), as células adquiriram morfologia poligonal, com grande citoplasma repleto de vacúolos citoplasmáticos (Figura 33 A). Após 10 dias de cultivo, através do ensaio de imunocitofluorescência foi observada a imunopositividade de proteínas não colágena da matriz extracelular encontrada em osteócitos e osteoblastos (Sialoproteína e Osteocalcina) (Figura 33 B e C). As células controles foram negativas para osteocalcina e sialoproteína (Figura 33 D e E).

A diferenciação condrogênica também foi eficiente para as células progenitoras do saco vitelino. As células progenitoras do saco vitelino na sexta passagem formaram uma micromassa celular no cultivo em suspensão em tubo de polipropileno de 15ml. Nos cortes histológicos corados com Azul de Toluidina foi observada pequena celularidade e as proteoglicanas da matriz extracelular (sulfato de proteoglicana) (Figura 34 A e B e Figura 36 A e C). As fibras colágenas foram demonstradas através da coloração Tricromo de Masson e Pricosirius e da imunofluorescência (Figura 35 A, B, C e D).

Através do método de polarização das fibras colágenas coradas pela técnica de pricosirius, foram identificadas fibras de coloração vermelha, sugerindo assim fibras colágenas do tipo I no saco vitelino. O gene agrecan o maior gene estrutural da cartilagem, foi verificado através da técnica de imunofluorescência na micromassa celular (Figura 36 B e D). As células não tratadas com o meio de diferenciação condrogênica não formaram a micromassa celular.

As células progenitoras do saco vitelino, após 8 dias de cultivo na oitava passagem diferenciaram para células semelhante a células musculares. A

diferenciação foi comprovada através da imunopositividade para a proteína muscular alfa-actinina sarcomérica (Figuras 37 A e B).

As células progenitoras do saco vitelino não foram capazes de diferenciar em adipócitos quando induzidas com meios específicos (Figura 38).

Figura 33 - Fotomicrografia da diferenciação osteogênica das células progenitoras do saco vitelino. Em B, C, D e E imunocitofluorescência para os anticorpos sialoproteína e LF32. Em A células diferenciadas em osteócitos coradas pelo método de Von Kossa, na seta áreas de calcificação. Em B células imunopositvas para sialoproteína (seta) e em C para osteocalcina (LF32) (seta). D e E controle negativos para sialoproteína e osteocalcina (LF32). (Azul= núcleo corado com DAPI e Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit)

Figura 34 - Fotomicrografia da diferenciação condrogênica das células progenitoras do saco vitelino, coradas pela técnica de Azul de Toluídina. Em A micromassa celular obtida a partir da indução com meio de diferenciação condrogênica com 21 dias de cultivo (seta preta). Em B em um maior aumento está evidenciada a celularidade e as estruturas semelhantes a proteoglicanas da matriz extracelular (seta preta). Barra= A 200 μ m e B 100 μ m

Figura 35 - Fotomicrografia da disposição das fibras colágenas na micromassa celular derivadas da diferenciação condrogênica das células progenitoras do saco vitelino, após 21 dias coradas pela técnica Tricromo de Masson (A, C e D) e técnica de polarização de fibras colágenas obtida pela coloração Picosirius (B). Fibras colágenas coradas em azul na micromassa celular (seta preta) em A, C e D. Em B as fibras colágenas em vermelho obtida através da técnica de polarização de fibras colágenas dispostas na micromassa condrogênica (seta branca)

Figura 36 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo agrecom da micromassa celular derivada a partir da diferenciação condrogênica das células progenitoras do saco vitelino com 30 dias de gestação. Em B e D verificar a imunopositividade para o anticorpo agrecom na micromassa celular (seta branca). Em A e C morfologia da micromassa celular condrogênica das células progenitoras da medula óssea (seta preta). Verde= fibra colágena, azul= núcleo corado com DAPI. (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti- mouse). Barras= A e B 200 µm

Figura 37 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo alfa-actinina sarcomêmica das células progenitoras do saco vitelino com 30 dias submetidas a diferenciação muscular. Em A e B morfologia das células semelhante às células musculares imunopositivas para o anticorpo alfa-actinina sarcomêmica (seta). Em B na seta células em processos de fusão (seta). (Azul= núcleo corado com DAPI e Verde- Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse)

Figura 38 - Fotomicrografia das células progenitoras do saco vitelino submetidas a diferenciação adipogênica. Nota-se células com características de células diferenciadas e a ausência de formação de depósitos de lipídios no citoplasma (seta) Barra=100 µm

6.10 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do saco vitelino *in vivo*

As células progenitoras do saco vitelino (1×10^6) expandidas em Meio de cultivo 5 em p6 foram aplicadas via intra-muscular no membro pélvico direito do camundongo nude. Após 35 dias não foi observada macroscopicamente a formação de teratomas (Figura 39).

Figura 39 - Membrão pélvico direito do camundongo nude sem formação de teratoma, após a aplicação intramuscular das células progenitoras do saco vitelino

CAPÍTULO II
RESULTADOS FÍGADO

7 RESULTADOS

Foram utilizados quatro meios de cultivo para o isolamento e expansão das células-tronco progenitoras do fígado.

7.1. Características das células proveniente da cultura primária do fígado fetal cultivadas em Meio de Cultivo 1

A partir do fragmento do fígado fetal canino *in vitro* com 30 e 60 dias de gestação verificou-se nos 3 dias iniciais de cultivo celular, uma intensa proliferação celular bem como acúmulos celulares, que se desprenderam do fragmento, (Figura 41B, C, Figura 42D). As células liberadas eram inicialmente circulares e não aderentes (Figura 40A, Figura 41 A e B).

Foram encontrados 4 tipos celulares, com morfologias distintas em diferentes períodos de cultivo. Inicialmente foram observadas células com morfologia semelhante a fibroblasto. Estas eram pequenas no início do cultivo com formato fusiforme com ou sem projeções citoplasmáticas, e com núcleo celular pouco evidente. As células com morfologia semelhante a fibroblasto eram predominantes em cultura, quando comparados com os outros tipos celulares (Figura 04B-C, Figura 41A-B, Figura 42C-D, Figura 43 A-B, e D).

O segundo tipo celular identificado foram células com formato ovóide, sendo bem evidentes próximas aos fragmentos hepáticos. Estas células apresentaram-se, arredondadas com citoplasma grande e núcleo oval pequeno, vale ressaltar que neste tipo celular havia uma grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (Figura 41C-D, Figura 43C).

Outro tipo celular identificado no cultivo foram células com várias projeções citoplasmáticas, a qual lhes confere um formato estrelado, bem semelhante a fibroblastos. Estas células eram grandes possuem o núcleo esparso, e projeções citoplasmáticas acentuadas (Figura 40D e Figura 41A).

Células semelhantes à célula epitelial foram encontradas em menor frequência. Estas apresentavam um citoplasma bem grande e núcleo circular pequeno (Figura 44 A, D).

As células com morfologia semelhante a fibroblasto foram expandidas, e após várias passagens, adquiriram características de células diferenciadas (células grandes, com citoplasma esparso), sendo que os outros tipos celulares desaparecem à medida que os repiques foram realizados.

Figura 40- Fotomicrografia das células derivadas do fragmento do fígado fetal com 30 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 1. Em A e B verificar células indiferenciadas não-aderentes derivadas do fragmento do cultivo (seta preta). E em B e C células aderentes com morfologia semelhante a fibroblasto (seta branca). Em D células com formato irregular e projeções citoplasmáticas, típicas de células estreladas (seta vermelha). Barra= A, B, C e D 50 μ m

Figura 41- Fotomicrografia dos tipos celulares derivados do fragmento hepático do fígado fetal com 30 dias de gestação, expandidas em Meio de Cultivo 1, com 15 dias de cultivo. Em A célula com morfologia semelhante a fibroblasto (seta preta) e a célula estrelada (seta amarela). Em B células com morfologia semelhante a fibroblastos com 70% de confluência. Em C e D células ovóides (seta branca) e em D observar a célula binucleada (N) e a intensa quantidade de organelas citoplasmáticas (Ct) (Barra= A, B, C e D 50 μ m)

Figura 42- Fotomicrografia do fragmento do Fígado com 60 dias de gestação, expandidas em Meio de Cultivo 1. Verificar em A células não-aderentes com 24 horas de cultivo. Em B e C o fragmento de cultivo liberando células progenitoras hepáticas (círculo) e células com morfologia semelhante a fibroblasto (seta branca). Em D estão evidenciadas células semelhantes a fibroblasto (seta branca). Barra= A, B, 25µm e C, D 50µm

Figura 43- Fotomicrografia do fragmento hepático em cultura com 60 dias de gestação com, 6 dias de cultivo, expandidas em Meio de Cultivo 1. Em A, B, C e D o caráter heterogêneo das células com morfologia semelhante a fibroblasto (seta branca). Na seta branca observar as células com morfologia semelhante a fibroblasto, células com formato fusiforme, enquanto que no círculo células com extensos prolongamentos citoplasmáticos em B. (seta preta). Barra= A, B, C e D 50 μ m

Figura 44 - Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento com 60 dias de gestação, com 12 dias de cultivo expandidas em Meio de Cultivo 1. Neste período notam-se em A, C e D dois tipos celulares em cultivo, células semelhantes a fibroblasto (seta vermelha) e células gigantes com o citoplasma esparso, bem semelhante a células semelhantes à célula epitelial (seta preta). Em B a morfologia das células semelhante à célula epitelial com 3 núcleos bem evidentes (seta amarela), e a grande quantidade de grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo. Barra=A 25 μ m, B, C e D- 50 μ m

7.2 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária de fígado fetal em Meio de Cultivo 2

Ao utilizar o Meio de cultivo 2, verificou-se que houve uma boa proliferação a partir do fígado fetal de 30 dias de gestação *in vitro*, quando comparado com o Meio de Cultivo 1.

As células aderentes liberadas pelo fragmento hepático eram heterogêneas morfolologicamente. Inicialmente as células semelhantes a fibroblasto eram pequenas e fusiformes com poucas projeções citoplasmáticas (Figura 45 A, B e C). Ao serem submetidas ao repique celular, estas células modificaram-se fenotipicamente, tornaram-se grandes com o citoplasma esparso e irregular (Figuras 46 C e D). Em menor frequência também foi identificada células semelhantes às células epiteliais, estas células eram circulares com citoplasma grandes e núcleo disposto centralmente na célula (Figura 45 A e C).

Figura 45 - Fotomicrografia dos tipos celulares derivadas do fragmento hepático com 30 dias de gestação, com 5 dias de expandidas em Meio de Cultivo 2. Neste período nota-se 2 populações celulares distintas em A, B e C. Na seta amarela células semelhante á célula epitelial e na seta preta célula células semelhante a fibroblasto. As células semelhantes a fibroblastos são fusiformes e pequenas (seta preta) em B, as células semelhantes ás células epiteliais são arredondadas e possuem o citoplasma grande (seta amarela). Barra= A 25µm, B, C= 50µm

Figura 46- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento hepático com 30 dias de gestação, com 5 dias de cultivo expandias em Meio de Cultivo 2. Em A e B células semelhante a fibroblastos após o primeiro repique com característica morfológica de células indiferenciadas enquanto que em C e D células com característica de célula diferenciada na terceira passagem de cultivo, células grandes com projeções citoplasmáticas (seta amarela). Barra= A e C 25 μ m, B e D 50 μ m

7.3 Características das células progenitoras provenientes da cultura primária do fígado em Meio de Cultivo 3

Ao implantar os tecidos em poços de cultivo de 30x15mm de diâmetro foi observada uma intensa proliferação celular proveniente dos pequenos fragmentos hepáticos com 35 dias e gestação, maior que quando se utilizou os Meios de Cultivos 2 e 3. As células aderentes liberadas pelo fragmento de cultivo possuíam inicialmente morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 47 A e B).

Após expansão celular foi notada uma população celular heterogênea morfologicamente. Nas primeiras passagens (P1 e P2) o cultivo era composto por células semelhante a fibroblasto (Figura 47A). Estas inicialmente eram menores e fusiformes com poucas projeções citoplasmáticas (Figura 47 A, B; C). Outro tipo celular freqüente no cultivo eram células achatadas com o citoplasma grande e irregular, de tamanhos variados (Figura 47C). Com a realização dos repiques celulares observou-se a predominância deste segundo tipo celular em cultura (Figura 47D).

Figura 47- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento hepático com 35 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 3. Células expandidas do fragmento hepático com morfologia semelhante a fibroblastos na primeira (A) e quarta passagem (B e C) de cultivo (seta amarela) Nesta figura verificar a diferença morfológica entre as células com morfologia semelhante a fibroblasto em A, B, C (seta preta). Em D células fibroblastóides com características de células diferenciadas (seta vermelha). Barra= A e C= 25 μ m e B e D 50 μ m

7.4 Características das células progenitoras provenientes de cultura primária do fígado em Meio de Cultivo 4

Ao utilizar o Meio de Cultivo 4 os fragmentos hepáticos derivaram células com morfologia semelhante a fibroblasto. O crescimento *in vitro* das células progenitoras foi bem semelhante a resultados obtidos com o Meio de Cultivo 3, porém mantiveram por um maior número de passagens a morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 48 A e B). As células derivadas do fragmento hepático (P1 a P5) eram composta por células semelhante a fibroblasto com morfologia fusiforme com poucas projeções citoplasmáticas (Figura 48 A e B).

Figura 48- Fotomicrografia das células progenitoras derivadas do fragmento hepático com 35 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 4. Células expandidas do fragmento hepático com morfologia semelhante a fibroblasto (A) e (B). Barra= A = 25 μ m e B e D= 50 μ m

7.5 Cariótipo

As células progenitoras isoladas do fragmento do fígado com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 4, na quinta passagem, demonstraram número normal de cromossomos ($2n=76$) (Figura 49).

FIGURA 49- Metáfase com número normal de cromossomos ($2n=76$) das células progenitoras do fígado com 30 dias de gestação. As células mantiveram o número normal de cromossomos durante sucessivas passagens *in vitro*. Corados por Giemsa. Barra= 100 μ m

7.6 Ensaio de Unidade formadora de colônia das células progenitoras do fígado cultivadas em Meio de Cultivo 4

As células progenitoras do fígado foram plaqueadas em placas de cultivo de 90mm de diâmetro. Após 10 dias de cultivo foi observada a formação de 42 colônias (42 colônias/ 10^3 células plaqueadas) homogêneas quanto ao diâmetro (Figura 50 A). As células das colônias com alta densidade celular (mais de 50 células) eram compostas por células semelhante a fibroblasto e bem homogêneas morfológicamente (Figura 50 B). Havia também células organizadas sob forma de colônias com baixa densidade celular, com células morfológicamente heterogêneas. Estas células possuíam aspecto estrelado eram grandes com citoplasma esparso e núcleo celular pequeno, característica de células diferenciadas (Figura 50C).

Figura 50 - Fotomicrografia do Ensaio de Unidade Formadora de Colônia das células progenitoras do fígado fetal em P1 cultivadas em Meio de Cultivo 4, após 10 dias de cultivo. Em A as colônias obtidas a partir de 10^3 células em placas de cultivo de 90mm de diâmetro. Em B colônia com alta densidade celular com morfologia fibroblastoíde, enquanto que em C células em baixa densidade celular organizadas sob forma de colônia com características de células diferenciadas. (setas pretas). Coloração de Cristal de Violeta. Barra B e C= 100 μ m

7.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Ao realizar os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão de células progenitoras do fígado fetal com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 3, foram identificadas duas populações celulares distintas: células semelhantes às células epiteliais (Figura 51 A, B, C,D) e mesenquimais (Figura 52 A,B,C,D).

As células semelhante às células epiteliais eram grandes em tamanho e possuía formato retangular (Figura 51 A). O citoplasma era grande e subdivido em duas regiões: perinuclear e periférica. A região perinuclear era demarcada pela presença de grânulos citoplasmáticos, sendo bem eletrodensa. Nesta região identificaram-se vacúolos de glicogênios e mitocôndrias. As mitocôndrias possuíam formato circular e alongado. A região periférica era menos eletrodensa e pobre em organelas citoplasmáticas, quando comparadas com a região perinuclear (Figura 51 A e B). O núcleo era lateralizado, grande e alongado, apresentando uma membrana nuclear irregular o qual lhe conferia um formato indefinido ao núcleo. A cromatina era escassa e dispersa (eucromatina), disposta de forma homogênea no núcleo. Os nucléolos também foram visíveis (Figura 15 A C). Entre as células semelhantes às células epiteliais eram visíveis estruturas como *gap junctions*. Estas estruturas são formadas pela união das membranas celulares, das células epiteliais e são características deste tipo celular (Figura 51 C e D).

Outro tipo de célula identificada na microscopia eletrônica de transmissão foram células semelhantes às células mesenquimais (Figuras 52A e B). Como descrito para células epiteliais o citoplasma era esparso, sendo também nitidamente dividida em duas regiões, região perinuclear (eletrodensa), repleta de grânulos e região periférica (menos eletrodensa) (Figuras 52 A, B e C). Também foram identificadas na região perinuclear, mitocôndrias, vacúolos e Complexo de Golgi. As mitocôndrias possuíam formato circular e alongado (Figura 52 D). Estas células eram ausentes de estruturas como canalículos biliares, porém suas membranas celulares continham vilosidades semelhantes à *pseudópodes*, característico de célula mesenquimal (Figura 52 A e B). O núcleo possuía membrana irregular e desorganizada. A cromatina era escassa e dispersa (Figuras 52 C e D).

Figura 51 - Eletromicrografia de Transmissão das células com morfologia semelhante à célula epitelial derivadas do cultivo células do fígado fetal com 30 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 3. Verificar a célula com morfologia semelhante à célula epitelial de formato retangular (seta amarela), O núcleo lateralizado na célula, observar seu formato grande e alongado (A e C), um grande citoplasma (Ct) dividido em duas regiões: região periférica (Rp) e região perinuclear (Rpnu) (A). Na região periférica mitocôndrias (seta amarela) e vacúolos de lipídeos (seta vermelha) (B). A seta identifica a conexão entre duas células epiteliais (*gap junctions*) (A). Em um maior aumento, estão evidenciadas as estruturas semelhantes aos canalículos biliares, formadas pela junção das membranas citoplasmáticas das células epiteliais (seta amarela) (C e D). N=núcleo (Nu) nucléolo (Aumento=A-3500/B-14000 vezes C/D =2800vezes)

Figura 52 - Eletromicrografia de Transmissão das células semelhante a célula mesenquimal derivadas do cultivo do fígado fetal com 30 dias de gestação, cultivadas em Meio de Cultivo 3. Nesta imagem verificar a diversidade morfológica entre as células com característica de células mesenquimais derivada do fígado em A e B (seta preta). O citoplasma (Ct) dividido em duas regiões: região periférica (Rp) e região perinuclear (Rpnu). O núcleo (N) e o núcleo (Nu). Em C e D à intensa granulosidade citoplasmática da região perinuclear (Rpnu) das células ovais e suas organelas citoplasmáticas. Em D as setas vermelhas identificam o Complexo de Golgi, na seta verde vacúolos de glicogênio e na seta amarela as mitocôndrias. Em A o núcleo e a escassa cromatina organizada de forma homogênea (seta branca) (Aumento=A/B-3500/CD8900 vezes)

7.8 Imunocitofluorescência

O imunofenótipo das células progenitoras do fígado com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 3 e 4 foram avaliadas através da técnica de imunocitofluorescência com os anticorpos monoclonais Oct-3/4 (fator de transcrição nuclear), Ve-caderina (anticorpo de célula progenitora endotelial) e marcadores citoplasmáticos de proteínas de filamento intermediário como: vimentina (característico de células mesenquimais e fibroblastos), nestina (característico de células progenitoras e de células progenitoras neuronais) e citoqueratina (característico de células epiteliais) e anticorpos hematopoiéticos CD13 e CD45.

A imunopositividade do anticorpo Oct-3/4 foi observada nas células com morfologia semelhante à célula epitelial (Figura 53A) e a fibroblasto (Figura 53 B, C e D). Para as células com morfologia semelhante a fibroblastos a imunolocalização do anticorpo ocorreu no núcleo e região perinuclear concomitantemente (Figura 53 B, C e D). Entretanto as células com morfologia semelhante à célula epitelial a imunopositividade ocorreu na região perinuclear (Figura 53 A).

Células com morfologia semelhante a fibroblasto e às células epiteliais também foram imunopositivas no citoplasma e citoesqueleto celular para o anticorpo vimentina (Figura 54 A e B), citoqueratina-18 (Figura 54 C e D) e nestina (Figura 54 E e F).

As células progenitoras do fígado fetal com 30 dias de gestação foram negativas para os anticorpos e hematopoiéticos (CD13 e CD45). (Figura 55 A e B) e endoteliais (ve-caderina) (Figura 55C).

Figura 53 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência das diferentes imunolocalizações do anticorpo OCT-3/4 nas células derivadas do fragmento hepático com 30 dias de gestação cultivadas em Meio de Cultivo 3.. Em A imunopositividade localizada na região perinuclear nas células semelhante à célula epitelial. Em B, C e D células com morfologia semelhantes à célula fibroblásticas imunopositivas no núcleo. Ct= citoplasma, Rpnu= região perinuclear, Nu= núcleo (*Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse*)

Figura 54 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência dos diferentes tipos de proteínas de filamento intermediário presentes nas células progenitoras do fígado com 30 dias de gestação cultivadas Meio de Cultivo 4. Imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da medula óssea para o anticorpo vimentina em A e B, citoqueratina em C e D e nestina em E e F (seta branca). Seta branca=células imunopositivas, Seta amarela= negativas, azul= núcleo corado com DAPI. (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse para citoqueratina e vimentina e secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit para nestina)

Figura 55- Fotomicrografia de imunocitofluorescência das células progenitoras do fígado negativas para os anticorpos CD45, CD13 e Ve-caderina isoladas do fígado com 30 dias de gestação isoladas Meio de Cultivo 4. Está evidenciada a ausência de imunofluorescência das células progenitoras do fígado perante a reação de imunocitofluorescência para os anticorpos hematopoiéticos CD45 (A), CD13 (B) e endotelial ve-caderina (C). Azul= núcleo corado com DAPI

7.9 Potencial de diferenciação das células progenitoras do fígado

As células progenitoras do fígado com 30 dias de gestação na sexta passagem de cultivo foram capazes de diferenciar em tecido ósseo e muscular. A diferenciação osteogênica foi mantida por 21 dias e após este período foi observado à intensa formação de matriz extracelular. As células progenitoras inicialmente continham morfologia fibroblastoíde e após a indução com o meio de diferenciação osteogênico (após 5 dias de cultivo), as células adquiriram morfologia poligonal, com grande citoplasma repleto de vacúolos citoplasmáticos (Figura 56 A). Através do ensaio de imunocitofluorescência foi possível observar a imunopositividade das células progenitoras submetidas a diferenciação osteogênica para a proteína não colágena da matriz extracelular encontrada em osteócitos e osteoblastos sialoproteína e osteocalcina (LF32), sendo verificada após 10 dias de cultivo (Figura 56 B e C). As células controles adquiriram morfologia de células diferenciadas eram grandes com prolongamentos citoplasmáticos, no entanto eram negativas para sialoproteína e osteocalcina (LF32) (Figura 56 D e E).

As células progenitoras do fígado, após 10 dias de cultivo na sexta passagem diferenciaram para células semelhantes a células musculares (Figura 57 A). A diferenciação foi comprovada através da imunopositividade para a proteína muscular alfa-actinina sarcomérica (Figura 57 B).

A diferenciação condrogênica e adipogênica não foi eficiente para as células progenitoras do fígado quando utilizados os meios de cultivos específicos. Não foi observada a formação da micromassa celular ao induzir as células progenitoras do fígado, com o meio de cultivo condrogênico em cultura em suspensão em tubo de polipropileno de 15ml.

As células da diferenciação submetidas a diferenciação adipogênica adquiriram morfologia de células diferenciadas, não sendo capazes de diferenciarem para adipócitos (Figura 58).

Figura 56 - Fotomicrografia da diferenciação osteogênica das células progenitoras do fígado. Em B, C, D e E imunocitofluorescência para os anticorpos sialoproteína e osteocalcina (LF32). Em A células diferenciadas em osteócitos coradas pelo método de Von Kossa, na seta áreas de calcificação. Em B células imunopositivas para osteocalcina (LF32) (seta) e em C para sialoproteína (seta). D e E controle negativos para sialoproteína e osteocalcina (LF32). (Azul= núcleo corado com DAPI e Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit)

Figura 57-Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo alfa-actinina sarcomérica das células progenitoras do fígado com 30 dias submetidas a diferenciação muscular. Em A morfologia das células semelhante as células musculares. Em B células imunopositivas para o anticorpo alfa-actinina sarcomérica (seta). (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse)

Figura 58 - Fotomicrografia das células progenitoras do fígado submetidas a diferenciação adipogênica. Nota-se ausência de formação de depósitos de lipídeos nas células com características de células diferenciadas (seta). Barra= 100µm

7.10 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras do fígado em camundongos nude

As células progenitoras do fígado (1×10^6) em P5 expandidas em Meio de Cultivo 4 foram aplicadas via intra-muscular no membro pélvico direito do camundongo nude. Após 30 dias não foi observada macroscopicamente a formação de teratomas (Figura 59).

Figura 59 - Membro pélvico direito do camundongo nude sem formação de teratoma, após a aplicação via intramuscular das células progenitoras do fígado

CAPÍTULO III
RESULTADOS MEDULA ÓSSEA

8 RESULTADOS

Foram utilizados quatro meios de cultivo para o isolamento e expansão das células-tronco progenitoras da medula óssea.

8.1 Características das células progenitoras da medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 1

As células mononucleares nos primeiros dias de cultivo apresentaram-se compostas por inúmeras células nucleadas não-aderentes. Após 48 horas de cultivo, as células flutuantes foram desprezadas restando somente uma população de células aderentes (Figura 60B), as quais se fixaram ao substrato, formando colônias (Figura 60D e 61A).

Inicialmente as células aderentes de medula óssea, eram pequenas variando do formato fusiforme a estrelado. Após 8 dias em cultivo apresentaram-se com características semelhante a fibroblasto, enfatizada por população celular heterogênea (Figura 60C).

As células semelhantes a fibroblasto possuíam formato fusiforme sendo alongadas, com uma membrana citoplasmática freqüentemente regular, sem ou com prolongamentos citoplasmáticos discretos (Figura 60 A e E Figura 61A e Figura 65B). As células de formato estrelado eram grandes e achatadas e apresentaram uma membrana celular irregular devido à presença de projeções citoplasmáticas (60B e Figura 61D). No citoplasma das células estreladas havia grande quantidade de grânulos citoplasmáticos, dispostos ao redor do núcleo. Estas células possuíam o núcleo ovóide sendo muitas vezes, uni ou binucleadas com um a dois nucléolos.

À medida que as células foram repicadas, predominaram células estreladas, característica esta conferida pela presença de prolongamentos citoplasmáticos (Figura 61B, C e D).

Figura 60 - Fotomicrografia do cultivo celular das células progenitoras da medula óssea fetal canina expandida em Meio de Cultivo 1. Em A células não-aderentes com 48 horas de cultivo (seta amarela). Em B e C colônia de células com morfologia semelhante a fibroblasto com 5 dias em cultivo (seta branca). Em D células com morfologia semelhante a fibroblasto com 70% de confluência com 15 dias de cultivo (seta). Em E células com morfologia semelhante a fibroblasto: células pequenas fusiformes com pequenos prolongamentos citoplasmáticos (seta preta) ou células sem prolongamentos, com 10 dias de cultivo (seta vermelha) Barra= A, C, D E barra 50 μ m e B 25 μ m

Figura 61 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea expandida em Meio de Cultivo 1. Em A morfologia das células semelhante a fibroblasto com 60% de confluência sem ação do *Tryple* (seta branca). Em B e C e D após a primeira passagem com 15 dias de cultivo. Observar as células de formato fusiforme (seta branca) e células maiores com prolongamentos citoplasmáticos ou células estreladas (seta preta). Barra= A, B, C e D 25μm

8.2 Características das células progenitoras da medula óssea, cultivadas em Meio de Cultivo 2

As células cultivadas em meio de cultivo em Meio de Cultivo 2 promoveu um bom crescimento celular. Inicialmente as células oriundas de medula óssea fetal canina, com 60 dias de gestação são morfológicamente nucleadas e encontraram-se flutuantes no meio de cultivo. Após 48 horas as células flutuantes foram desprezadas, e observamos pequenas colônias celulares aderentes com morfologia semelhante a fibroblasto.

As células aderentes de medula óssea obtiveram a confluência em torno de 80%, com 15 dias de cultivo, neste período foi realizado o primeiro repique. Nesta fase não foi possível visualizar colônias, pois as células dispunham-se sob toda garrafa de cultivo (Figura 62 P2). As células aderentes de medula óssea eram pequenas, com características semelhantes a fibroblasto, freqüentemente possuem poucos prolongamentos citoplasmáticos e organelas citoplasmáticas. (Figura 62) Com menor freqüência, foram identificadas células maiores com o citoplasma esparso, e formato estrelado.

Estas células foram mantidas em cultura até a décima quarta passagem, sendo observadas até a quinta passagem as células mantiveram morfologia uniforme, com característica semelhante a fibroblasto (Figura 62 P2, P3, P4, P5, P6, P7). Porém, é notável a significativa queda no número celular à medida em que as células eram submetidas ao repique celular (Figura 62: P8 e P9).

Figura 62 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea de fetos submetidos ao repique celular diário através do *Tryple* cultivadas em Meio de Cultivo 2. As imagens acima permitem a visualização de células com características semelhantes a fibroblasto durante as diferentes passagens de cultivo (P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 e P9). Barra= 25μm

8.3 Características das células progenitoras da medula óssea, cultivadas em Meio de Cultivo 3

Ao utilizar o Meio de Cultivo 3 foi observado uma lenta taxa de crescimento celular, pois durante um período de 25 dias de cultivo as mesmas não foram expandidas, uma vez que, que não atingiram uma confluência adequada (80%). As células eram grandes no formato, com o citoplasma esparso sendo uni ou binucleadas, com uma intensa quantidade de grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo (Figura 63A). Comportaram-se *in vitro*, sob forma de pequenas colônias na placa de cultivo. (Figura 63B e C). Estas características assemelham-se a célula diferenciada (Figura 63 C).

Figura 63 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea com característica de células senescentes cultivadas com Meio de Cultivo 2. Em A células com 15 dias de cultivo de formato irregular e com projeções citoplasmáticas. Nas figuras B e C observamos com 30 dias de cultivo com morfologia de células diferenciadas (seta branca). Barra= A, B e C 25μm

8.4 Características de células aderentes de medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4

As células da medula óssea de fetos caninos, obtidas através da lavagem do canal medula foram isoladas em meio de cultivo Meio de Cultivo 4, atingiram resultados semelhantes aos colhidos, para células mononucleares de medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 2. As células aderentes de medula óssea tiveram crescimento rápido *in vitro*, sendo que, com 3 dias de cultivo atingiram confluência de 80%. Após atingirem a confluência as mesmas foram submetidas ao primeiro repique celular. Estas células cresceram sob forma de monocamada e apresentaram morfologia semelhante a fibroblasto (Figura 64). As células semelhantes a fibroblasto eram pequenas, com aspecto fusiforme e pequeno citoplasma (Figura 64).

Figura 64 - Fotomicrografia das células progenitoras isoladas do aspirado da medula óssea de fetos caninos na terceira passagem de cultivo, cultivadas em Meio de Cultivo 4. Morfologia homogênea semelhante a fibroblasto com 70% confluência. Barra= 25 μ m

8.5 Cariótipo

As células progenitoras isoladas da medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4, na sexta passagem, demonstraram número normal de cromossomos ($2n=76$). (Figura 65)

Figura 65 - Metáfase com número normal de cromossomos ($2n=76$) das células progenitoras da medula óssea de fetos caninos. As células mantiveram o número normal de cromossomos durante sucessivas passagens *in vitro*. Corados por Giemsa. Barra= 100 μ m

8.6 Curva de Crescimento Celular

A curva de crescimento foi realizada somente nas células cultivadas com Meio de Cultivo 2 pois nestas condições as células atingiram a confluência adequada (80%), para realizar o repique mantendo-se indiferenciadas em proliferação, por um período maior em cultura. (Gráfico 1).

A curva de crescimento foi realizada em triplicata a cada 24 horas o qual possibilitou demonstrar o comportamento das células, quando cultivadas em Meio de Cultivo 2 (Gráfico 1). Nota-se um pico no crescimento celular durante a primeira e a segunda passagem, e uma queda no número celular a partir da terceira passagem (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva de Crescimento das células progenitoras da medula óssea de fetos de cães com idade gestacional de 60 dias cultivadas em Meio de Cultivo 2

8.7 Ensaio de unidade formadora de colônia

As células progenitoras da medula óssea foram submetidas ao ensaio de unidade formadora de colônia, para isto 10^3 células progenitoras da medula óssea em P1 foram plaqueadas em placas de cultivo de 90mm de diâmetro. Após 10 dias de cultivo foi verificada a formação de 17 colônias ($17 \text{ colônias}/10^3 \text{ células plaqueadas}$), estas continham mais de 50 células sendo homogêneo quanto o diâmetro (Figura 66 A). As células das colônias com alta densidade celular eram homogêneas morfolologicamente e apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos. As colônias eram confluentes propiciando a sobreposição entre as células (Figura 66 B). No entanto, algumas colônias eram compostas por células fibroblastoídes fusiformes e achatadas. Foi possível verificar também células organizadas sob forma de colônias com baixa densidade celular. Neste caso, as células apresentavam-se morfolologicamente heterogêneas, com aspecto estrelado citoplasma esparso e núcleo celular pequeno, característica sugestiva de células diferenciadas (Figura 66 C).

Figura 66 - Fotomicrografia do Ensaio de Unidade Formadora de Colônia das células progenitoras da medula óssea em P1 cultivadas com o Meio de Cultivo 4, após 10 dias de cultivo. Em A colônias obtidas a partir de 10^3 células plaqueadas em placas de cultivo 90mm de diâmetro. Em B colônia com alta densidade celular e C células organizadas sob forma de colônias. Observar os dois tipos de células em ambas as colônias, células fibroblastoides (seta preta) e células achatadas (seta branca) em B e C. Coloração Cristal de Violeta. Barra B e C= 100µm

8.8 Citometria de fluxo

As células progenitoras da medula óssea isoladas da medula óssea de fetos caninos, por gradiente de densidade FICOLL-PAQUE-1075, cultivadas em Meio de cultivo 2 foram submetidas á técnica de citometria de fluxo com os seguintes anticorpos monoclonais: CD117, CD44, CD31, CD13, CD90, CD45, CD14 e CD29 (Figura 67). Dentre os marcadores enumerados acima as células foram positivas somente para o anticorpo de adesão celular (CD44), na porcentagem de 96, 55% (Figura 72). Porém os outros anticorpos sugestivos para linhagem mesenquimal (CD29 CD13, CD14, CD90) foram negativos (Figura 67). Anticorpos de linhagem eritropoiética e endotelial (CD45, CD117, CD31) também foram negativos para células progenitoras da medula óssea com valores numéricos de expressão inferiores a 4,55% (Figura 67).

Figura 67- imunofenotipagem das células progenitoras da medula óssea. A expressão antigênica das glicoproteínas de superfície das células-tronco mesenquimais foi avaliada por citometria de fluxo pela técnica de imunofenotipagem e encontra-se expressa na forma de histogramas: CD44+ e CD13-, CD29-, CD31-, CD90-, CD45-, CD14

8.9 Microscopia eletrônica de transmissão

As células progenitoras da medula óssea isoladas da medula óssea de fetos caninos em Meio de Cultivo 4, ao serem analisadas morfolologicamente através da microscopia eletrônica de transmissão, revelaram uma população celular composta por células com morfologia semelhantes às células embrionárias (Figura 68), mesenquimal (Figura 69 A, B, C e D) e monócitos (Figura 69 A e B).

As células com morfologia embrionária apresentavam núcleo grande e escasso citoplasma, o que lhes confere alta proporção núcleo-citoplasma. O núcleo era circular em formato e preferencialmente eucromático, localizando-se centralmente no citoplasma. Seu citoplasma é pobre em organelas citoplasmáticas, sendo somente identificado vacúolos de nitrogênio. Na membrana citoplasmática identificam-se finos e escassos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 69).

Outro tipo celular identificado em maior número foram células com morfologia semelhante à célula mesenquimal. Estas células variam quanto ao tamanho e proporção do núcleo citoplasma. Estas células eram divididas em duas populações celulares distintas, células com núcleo celular grande e células com núcleo menor (Figura 70 A, B, C e D). Em geral o citoplasma deste tipo celular era granuloso, conferido pela presença de organelas citoplasmáticas. No citoplasma das células mesenquimais foram identificadas, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Extensões citoplasmáticas proeminentes foram identificadas em toda a célula (Figura 70B).

Em menor frequência foram visualizados os monócitos. Estas células eram grandes em tamanho, apresentavam o núcleo lateralizado, com grande citoplasma repleto de organelas citoplasmáticas. Longos processos pseudopoidias foram identificados na periferia celular (Figura 71 A e B). O núcleo era oval com uma discreta curvatura central, com um a dois nucléolos. Regiões de eucromatina eram evidentes (Figura 71 A e B). No citoplasma foram encontrados o Reticulo endoplasmático rugoso, Aparato de Golgi, mitocôndrias, vacúolos de lipídeos e lisossomos. O Reticulo endoplasmático rugoso localizava ao redor do núcleo. O

Aparato de Golgi era abundante no citoplasma, sendo dilatado. A mitocôndria foi encontrada em grande número, com dois formatos distintos, ovais e alongadas. Os vacúolos de lipídeos e os lisossomos eram estruturas circulares e diferentes quanto a intensidade da eletrodensidade. Os lisossomos eram eletrodensos enquanto que os vacúolos de lipídeos não (Figura 71).

Figura 68 – Fotoeletromicrografia de Transmissão das células com morfologia semelhantes às células embrionárias da medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4. As células com morfologia embrionária possuem a alta proporção núcleo (N) citoplasma (Ct). Observar o escasso citoplasma (Ct) a pouca quantidade de organelas citoplasmáticas e a presença de vacúolos de glicogênio (seta vermelha). Na Seta preta os prolongamentos citoplasmáticos (Aumento=7100 vezes)

Figura 69 – Fotoeletromicrografia de Transmissão das células com morfologia semelhante à célula mesenquimal da medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4. Em A, B, C e D células com morfologia fibroblastoíde possuem uma maior proporção núcleo (N) citoplasma (Ct). Observar os diferentes tamanhos dos núcleos (N) das células fibroblastoídes em A. Em B e C núcleo grande quando comparado com a célula fibroblastoíde em D. Estão evidenciados o citoplasma granuloso (Ct) e os prolongamentos citoplasmáticos (seta). Nu= nucléolo (Aumento=7100 vezes)

Figura 70 – Fotoeletromicrografia de Transmissão de células com morfologia semelhante à célula mesenquimal da medula óssea expandidas em Meio de Cultivo 4. Em A célula com morfologia mesenquimal. No citoplasma (Ct) observar o Aparato de Golgi (seta amarela), mitocôndrias (seta vermelha) e vacúolos de glicogênio (G) (B). No núcleo está apontada a eucromatina (B). Seta preta= pseudópodes núcleo (N) citoplasma (Ct) (A) (A=7100 vezes B=Aumento=8900 vezes)

Figura 71 – Eletromicrografia de Transmissão de células com morfologia semelhante a monócitos de medula óssea expandidas em Meio de Cultivo 4 . Nesta imagem células com características monocíticas: núcleo de formato oval e lateralizado (N), citoplasma esparso (Ct) (A). No citoplasma observar o Reticulo endoplasmático rugoso (seta verde), Aparato de Golgi (seta vermelha), lisossomo (L) e mitocôndrias (M). No núcleo evidencia-se o nucléolo (Nu) e a membrana nuclear (seta amarela) (B). Na seta pseudópodes (seta preta) (A) (A e B). N= núcleo, Nu= nucléolo (Aumento=A=3.500 / B=800 vezes)

8.10 Imunocitofluorescência

As células progenitoras da medula óssea isoladas do aspirado medular fetal, cultivadas em Meio de Cultivo 4 foram submetidas aos ensaios de imunocitofluorescência para caracterização imunofenotípica.

Os resultados revelaram a imunopositividade para as proteínas de filamento intermediário: vimentina (característico de células de origem mesenquimal) (Figura 72A), citoqueratina-18 (característico de células de origem epitelial) (Figura 72B) e nestina (Figura 72C) (característicos de células progenitoras e células progenitoras neuronais). A imunopositividade do anticorpo vimentina e citoqueratina foram altos quando comparado a nestina (Figura 72A, B e C).

A imunopositividade para o anticorpo Oct-3/4 (característico de células pluripotentes) foi verificada em uma pequena população das células na região pericitoplasmática (Figura 73).

As células progenitoras da medula óssea células foram negativas para os anticorpos hematopoiéticos CD45 (Figura 74A) CD13 (Figura 74B) e endoteliais vecaderina (Figura 74C).

Figura 72-Fotomicrografia de imunocitofluorescência dos diferentes tipos de proteínas de filamento intermediário presentes nas células progenitoras da medula óssea, em Meio de Cultivo 4. alta imunopositividade no citoplasma das células para o anticorpo vimentina em A, citoqueratina em B nestina em C. Ct= citoplasma, azul= núcleo. (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse para citoqueratina e vimentina e anti-rabbit para nestina)

Figura 73- Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo OCT-3/4 das progenitoras da medula óssea isoladas do aspirado da medula óssea fetal em Meio de Cultivo 4. Verificar a discreta imunopositividade na região perinuclear para o anticorpo Oct3/4 (seta branca). Azul= núcleo DAPI (Verde- Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-goat)

Figura 74- Fotomicrografia de imunocitofluorescência das células progenitoras da medula óssea negativas para os anticorpos CD45, CD13 e ve-caderina das células isoladas do aspirado da medula óssea fetal em Meio de Cultivo 4. Verificar a ausência de imunofluorescência das células progenitoras da medula óssea perante a reação de imunocitofluorescência para os anticorpos hematopoiéticos CD45 (A), CD13 (B) e endotelial ve-caderina (C). Azul= núcleo corado com DAPI

8.11 Potencial de diferenciação das células progenitoras da medula óssea

As células progenitoras da medula óssea de fetos de termo na sexta passagem foram capazes de diferenciar em tecidos ósseos, cartilaginoso e muscular em cultura com meios de cultivos específicos.

A diferenciação osteogênica foi mantida por 21 dias e após este período foi observado a formação de matriz extracelular. As células progenitoras inicialmente continham morfologia fibroblastoíde e após a indução com o meio de diferenciação osteogênico (após 16 dias de cultivo), as células adquiriram morfologia poligonal, com grande citoplasma repleto de vacúolos citoplasmáticos (Figura 75A). Após 10 dias de cultivo foi verificada a imunopositividade de proteínas ósseas como sialoproteína (Figura 75B) e osteocalcina (LF32) (Figura 75C) e através do ensaio de imunocitofluorescência. As células controles adquiriram morfologia de células diferenciadas e eram grandes com prolongamentos citoplasmáticos, sendo negativas pra osteocalcina e LF32.

A diferenciação condrogênica também foi observada nas células progenitoras da medula óssea. As células progenitoras da medula óssea, na sexta passagem formaram uma micromassa celular no cultivo em suspensão em tubo de polipropileno de 15ml. As células foram incluídas em paraplast com 21 dias de cultura e foram posteriormente cortadas e coradas. Através da coloração Azul de Toluidina foi observada a celularidade e as proteoglicanas da matriz extracelular (sulfato de proteoglicana) (Figura 76A, B, C e D e Figura 79D)

A coloração Tricromo de Masson e Pricosirius revelou uma grande quantidade de fibras colágenas dispostas na micromassa celular, estruturas semelhantes a lacunas condrocitárias e condrócitos (Figura 77 A, B, C, e D Figura 79C). Através do método de polarização das fibras colágenas realizada pela técnica de Pricosirius, foram identificadas fibras de coloração vermelha, sugerindo assim fibras colágenas do tipo I (Figura 78 A, B, C, e D). No entanto, ao realizar a imunofluorescência foram observadas fibras de colágeno tipo II (Figura 79 A e B). As células progenitoras da

medula óssea cultivadas em Meio de Cultivo 4 tubos de polipropileno de 15ml não formaram a micromassa celular.

As células progenitoras da medula óssea, após 10 dias de cultivo na oitava passagem diferenciaram para células semelhantes a células musculares. Em cultura estas células apresentavam-se orientadas paralelamente uma as outras com formação de multicamadas, altamente confluentes (80A). A diferenciação foi comprovada através da imunopositividade para a proteína muscular alfa-actinina sarcomérica (Figura 80B).

Ao induzir a diferenciação neuronal, as células progenitoras da medula óssea demonstraram-se morfológicamente semelhante a neurônios (Figura 82 A, B,C).

No entanto as células progenitoras da medula óssea não foram capazes para diferenciar em células adipogênicas, ao utilizar os meios de cultivos específicos. As células adquiriram morfologia de células diferenciadas (Figura 81).

Figura 75 - Fotomicrografia da diferenciação osteogênica das células progenitoras da medula óssea. Em B, C, imunocitofluorescência para os anticorpos sialoproteína e osteocalcina (LF32). Em A células diferenciadas em osteócitos coradas pelo método de Von Kossa, na seta áreas de calcificação. Em B células imunopositvas para sialoproteína (seta) e em C para osteocalcina (LF32) (seta). (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit). Barras A =100µm e B e C 200µm

Figura 76 - Fotomicrografia da diferenciação condrogênica das células progenitoras da medula óssea coradas pela técnica de Azul de Toluídina. Em A e B micromassa celular obtida a partir da indução com meio de diferenciação condrogênico com 21 dias de cultivo (seta preta). Em C e D em um maior aumento verificar a celularidade e as estruturas semelhantes a proteoglicanas da matriz extracelular (seta preta). Barra A e B= 200 μ m e D e C-100 μ m

Figura 77 - Formação de estruturas semelhante a lacuna condrocitária e fibras colágenas na micromassa celular derivada da diferenciação condrogênica das células progenitoras da medula óssea, coradas pela técnica de Tricromo de Masson. Fibras colágenas coradas em azul na micromassa celular (seta preta) em A, B, C e D. Em C e D estruturas semelhante a lacuna condrocitária (seta preta) e condrócitos (seta amarela)

Figura 78 - Disposição das fibras colágenas na micromassa celular derivadas da diferenciação condrogênica das células progenitoras da medula óssea após 21 dias coradas pela técnica de pricosirius. Em B e D fibras colágenas coradas em vermelho obtidas pela técnica de polarização de fibras colágenas da micromassa celular enquanto que A em B micromassa celular corada pela técnica de pricosirius sem polarização. Barra=A e C-100 μ m

Figura 79 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo colágeno II nas fibras colágenas da micromassa celular derivadas da diferenciação condrogênica das células progenitoras da medula óssea após 21 dias. Em A e B verificar a imunopositividade para o anticorpo colágeno II nas fibras colágenas da micromassa celular (seta branca). Em C e D morfologia das fibras colágenas da micromassa celular condrogênica das células progenitoras da medula óssea (seta preta). Verde= fibra colágena, azul= núcleo. (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit). Em A, C e D Barra-200µm

Figura 80 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea submetidas à diferenciação muscular. Em A observar a morfologia das células semelhante às células musculares. Em B estão evidenciadas células imunopositivas para o anticorpo alfa-actinina sarcomérica (seta). (Verde-Anticorpo secundário fluorescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse)

Figura 81 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea submetidas à diferenciação adipogênica. Nota-se ausência de formação de depósitos de lipídeos nas células com características de células diferenciadas (seta). Barra= 100µm

Figura 82 - Fotomicrografia das células progenitoras da medula óssea com morfologia semelhante a neurônios após serem submetidas à diferenciação neuronal (seta). Barra= 100µm

8.12 Avaliação do potencial teratogênico das células progenitoras da medula óssea em camundongos nude

As células progenitoras da medula óssea (1×10^6) em P6 expandidas em Meio de Cultivo 4, foram aplicadas via intra-muscular no membro pélvico direito do camundongo. Após 35 dias não foi observada macroscopicamente a formação de teratomas (Figura 83).

Figura 88 - Membro pélvico direito do camundongo nude sem formação de teratoma após a aplicação intramuscular das células progenitoras da medula óssea

9 DISCUSSÃO

Há uma variedade de terminologia para definir e classificar as células-tronco. Classicamente, as células-tronco possuem três características: capacidade de auto-renovação, ou a habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula mãe; b) capacidade de uma única célula de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares; c) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (VERFAILLIE, 2002). Verfaillie identificou células progenitoras da medula óssea, estas conceitualmente são células comprometidas com uma determinada linhagem celular. Portanto, possuem capacidade de auto-renovação limitada ou ausente e habilidade de se diferenciar apenas em tipos celulares previamente definidos (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005), ou seja, em células especializadas da linhagem celular em questão. Frente a estas definições classificamos as células estabelecidas dos tecidos fetais saco vitelino, fígado e medula óssea como células progenitoras. Os resultados quanto às características de cultivo, morfologia e plasticidade das células fetais caninas assemelham as células-tronco mesenquimais e este tipo celular é um dos principais tipos de células-tronco adultas com mais informações na literatura.

Atualmente há um crescimento nos estudos relacionados com células-tronco e terapia celular em cães, pois este modelo animal apresenta semelhança fisiológica com os humanos. Com o aumento da sobrevida dos cães domésticos e dos estudos em medicina veterinária surgiu a necessidade de novas abordagens terapêuticas para o tratamento de doenças nestes animais, dentre elas a terapia celular com células-tronco. Ainda, temas relacionados as células tronco fetais e a coleta de estruturas fetais como fontes de obtenção de células-tronco, carecem de informações na espécie canina. Tal fato é justificado pela dificuldade existente em torno da estimativa da idade embrionária e fetal. Em carnívoros face às características reprodutivas da espécie, como por exemplo: a idade da progenitora, número de gestações múltiplas (HAFEZ, 2003); a grande variação do período de pró-estro e estro (em média 9 dias); o grande intervalo existente na ovulação, (geralmente ocorre no período de 72-42 horas após o

pico plasmático de hormônio luteinizante); e os espermatozóides que podem sobreviver por até 7 dias no trato genital feminino (TONIOLLO et al., 1993) torna-se difícil a determinação exata da idade do animal.

De modo semelhante, foram encontradas dificuldades para se estimar a idade fetal, uma vez que, todo material foi coletado de campanhas de castrações, valendo-se da estimativa das idades fetais pelo cálculo do *Crow-rump*. Adicionamos a este cálculo as características morfológicas dos embriões e fetos. Estes dados apontaram similaridades com os autores Evans e Sack (1973) para cão, porém há discrepâncias em relação à idade fetal.

Diante destas informações o presente trabalho propôs o isolamento e caracterização das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos, bem como a avaliação de seu potencial.

Com base no desenvolvimento biológico da espécie canina e também os eventos de migração celular aos sítios hematopoiéticos durante o desenvolvimento embrionário e fetal, as idades gestacionais adequadas para o isolamento de células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea variam. Para saco vitelino o período ideal varia do 15º ao 30º dia de gestação; enquanto o fígado fetal o período ideal varia do 25º ao 45º dia de gestação, e medula óssea o período ideal varia do 50º ao 60º dia de gestação. Estes dados podem ser explicados pela ação transitória e temporária dos nichos hematopoiéticos e células estromais que se iniciam no saco vitelino, seguindo para o fígado e por último na medula óssea.

As células-tronco mesenquimais da medula óssea fetal canina foram isoladas por uma metodologia similar à originalmente descrita por Friedenstein et al. (1976) e popularizada por Caplan (1991), a qual utiliza a propriedade física dessas células de aderência ao plástico. As células progenitoras da medula óssea apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos e uma alta taxa de crescimento e multiplicação celular. Ao que se refere as células-tronco mesenquimais provenientes do cultivo de fígado fetal e saco vitelino, há poucos estudos referentes à obtenção, cultivo, expansão e caracterização dessas células-tronco. Foi possível identificar nos cultivos, tanto do fígado quanto do saco vitelino, células com morfologia semelhantes a fibroblastos, porém ambas as populações celulares eram heterogênea. Torna-se nítida a diferença

relacionada em nível de expansão *in vitro* das células fibroblastoídes derivadas da medula óssea quando comparadas as de saco vitelino e fígado. Estas últimas apresentaram uma taxa de proliferação inferior as células medulares.

Para a obtenção destes resultados, a escolha de meios de cultivo adequados, substâncias e suplementos são um fator determinante para o sucesso do cultivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os meios de cultivo utilizados eram basicamente suplementados com soro fetal bovino e aminoácidos não-essências. Dentre os diferentes meios de cultivo utilizados para isolar as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea, foram obtidos melhores resultados ao utilizar o meio de cultivo composto por alfa-MEM 15% SFB-hyclone, 1% de aminoácidos não essenciais, L-glutamina e antibiótico (Meio de Cultivo 5 para saco vitelino e 4 para fígado e medula óssea). Este meio de cultivo propiciou células com morfologia semelhante a fibroblastos e uma melhor taxa de expansão *in vitro*. Os demais meios de cultivo para saco vitelino e fígado propiciaram a expansão de cultivos celulares heterogêneos: células com morfologia semelhante à célula epitelial e fibroblastos.

Para saco vitelino a incidência de células com morfologia semelhante a fibroblastos é maior quando foram utilizados os meios de cultivo 1, 2, 3 e 5 do que quando se utilizou o meio de Cultivo 4, no qual foi observado uma maior proporção de células com morfologia semelhante a célula epitelial. Wang et al. (2008) isolaram do saco vitelino de humanos células fibroblastoídes morfolologicamente homogêneas por várias passagens utilizando meio de cultivo suplementado com fator de crescimento fibroblastoíde (FGF). Uma das principais função dos factores de crescimento é o controle externo do ciclo celular, abandono da quiescência celular (fase G0) e entrada da célula na fase G1, isto explica a manutenção das células mesenquimais do saco vitelino de fetos humanos por várias passagens com morfologia homogênea.

Ao empregar o uso dos meios 3 e 4 para fígado, observou-se que estes meios fornecem o crescimento de tipos celulares morfolologicamente menos heterogêneos, sendo maior a incidência de células semelhantes a fibroblastos, quando comparados com o meio 1. Ao utilizar o meio 1 foi verificado uma maior diversidade morfológica derivada do fragmento hepático *in vitro* e com capacidade de expansão limitada.

Lázaro et al. (1998) relataram em seus experimentos que células do fígado de rato se apresentaram alongadas, sendo que algumas adquiriram uma aparência estrelada. Corroborando aos resultados obtidos por este autor ao utilizar os meios 1, 2 e 3, a aquisição desta morfologia surge à medida que estas células são repicadas ou são mantidas por um longo período em cultura.

Ao cultivar as células da medula óssea com os meios 1, 2 e 4 foram obtidas células pequenas e fusiformes, bem semelhantes à morfologia descrita por inúmeros trabalhos (FRIEDENSTEIN et al., 1976; CAPLAN, 1991), enquanto que as células expandidas com o meio 2 eram morfologicamente grandes e estreladas, características estas de células diferenciadas. Somente com a utilização o meio 4 as mesmas mantiveram a morfologia semelhantes a fibroblastos por maior período *in vitro*. Dados estes distintos do que foi estabelecido por vários trabalhos para a expansão de células-tronco mesenquimais da medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1976 ;CAPLAN, 1991) e tecido adiposo (MEIRELLES, 2009).

Outro ponto importante para o cultivo de células-tronco de tecidos é o método empregado para o isolamento das células. Para medula óssea, o cultivo deste tipo celular envolve o isolamento de células mononucleares do concentrado aspirado da medula em meio essencial mínimo suplementado com SFB. Após 24-48 horas, as células hematopoiéticas não aderentes são removidas, permanecendo desta forma somente uma população de células aderentes (BRUDER et al., 1997). Como descrito Friedenstein (1976) e Caplan (1991), foram utilizados os ensaios de isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade Ficoll-Paque, com a finalidade de obter uma população de células mononucleares livre de células hematopoiéticas.

Durante o percurso do projeto várias dificuldades foram encontradas para o isolamento das células mononucleares da medula óssea de fetos caninos. Estas dificuldades estão diretamente relacionadas, com o pequeno volume de amostra coletada a partir da lavagem do canal medular dos fetos. Em vista às dificuldades de isolamento das células mononucleares da medula óssea de fetos caninos por gradiente de densidade, optou-se pela realização de ensaios para a expansão de células progenitoras da medula óssea sem separação por gradiente de densidade. Esta metodologia foi previamente elaborada e defendida por Dexter et al. (1977). Os autores

desenvolveram sistema de cultivo celular para células estromais de medula óssea na presença de células hematopoiéticas. Outro fator importante na escolha deste método de isolamento de células mesenquimais é o fato de a medula óssea fetal conter pouca quantidade de células hematopoiéticas, quando comparado a medula óssea adulta. As células foram cultivadas em placas de cultivo e expandiram rapidamente em cultura.

A capacidade de expansão das células progenitoras da medula óssea é maior do que das células progenitoras do saco vitelino e fígado. Isto é explicado, pois o saco vitelino é um anexo embrionário, ou seja, seu tempo de vida corresponde somente ao embrionário e fetal. Já o fígado apesar de permanecer pós-natal, sua população de células-tronco está comprometida com linhagens hepáticas e biliares, contendo populações de células-tronco somente no período hematopoiético correspondente. Enquanto que a medula óssea pós-natal é um nicho de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas. Estes dados são confirmados através da curva de crescimento celular, no qual apenas as células progenitoras da medula óssea foram capazes de proliferar durante várias passagens e as progenitoras do saco vitelino e fígado apresentou um potencial de expansão limitado, ou seja, apenas durante poucas passagens.

Outra característica das células-tronco mesenquimais é a capacidade de formação de colônias, quando cultivadas em baixa densidade, estas são identificadas como unidade formadora de colônia fibroblastoíde (do inglês *colony forming units-fibroblastic* CFU-f) (FRIEDENSTEIN et al., 1976).

Sendo assim, ao realizar o ensaio CFU-f das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea consideramos as colônias fibroblastoídes com mais de 50 células (TONDREAU et al., 2004). A capacidade de formar CFU-f das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea foram diferentes, sendo mais eficiente nas células progenitoras do fígado ($4,2 \times 10^4$), seguida pela medula óssea (2×10^4) e saco vitelino ($0,5 \times 10^4$). Ao compararmos com o ensaio CFU-f das células derivadas da polpa dentária ($22-70 \times 10^4$) (GRONTHOS e al., 2000) e medula óssea ($2,4-3 \times 10^4$) (KUO et al., 1992), a eficiência semelhante para as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea. As colônias com mais de 50 células possuíam morfologia fibroblastoíde sugerindo a clogenicidade das células dos tecidos fetais

caninos. Entretanto a menor eficiência em formar colônia da medula óssea adulta quando comparada com a medula óssea fetal, pode ser explicado pela sua composição celular a qual é predominante de células-tronco hematopoiéticas.

Após expansão realizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para identificar ultraestruturalmente as células progenitoras dos tecidos fetais. As análises ultraestruturais foram realizadas nas células do saco vitelino, fígado e medula óssea cultivadas com os meios 7; 3 e 4, respectivamente. Os resultados ultraestruturais das culturas das células progenitoras do saco vitelino e medula óssea revelaram células com morfologia semelhante às células-tronco embrionárias e mesenquimais, enquanto a população celular isolada do fígado era composta por células mesenquimais e epiteliais.

As células com morfologia embrionária derivadas do saco vitelino e medula óssea apresentavam um grande núcleo eucromático, rodeado por um escasso citoplasma. Células com as mesmas características morfológicas foram identificadas na medula óssea de fetos de camundongos (BELTRAMI et al., 2007).

As células epiteliais do fígado de cães foram identificadas pela presença de estruturas semelhantes a canalículos biliares. Estes achados assemelham aos de Dan et al. (2006) para células do fígado fetal humano. Em cultura as células do fígado fetal humano possuíam aspecto achatado com formato poligonal. Vale ressaltar que diferentemente de Dan et al. (2006), foram obtidas células com características morfológicas de células hepáticas caninas, sem monocamada de colágeno, em meio 3, mesmo não utilizando meios de cultivos que favoreçam o isolamento deste tipo celular, como utilizado pelos autores. Da mesma forma Azuma et al. (2003) isolaram através da digestão enzimática com collagenase duas populações celulares de fígado de fetos de ratos: células poligonais e células alongadas. Esses achados morfológicos assemelham-se aos resultados ultraestruturais para o fígado de fetos caninos. Esses resultados ressaltam a alta capacidade do fígado em gerar células morfolologicamente heterogêneas *in vitro*, independente da técnica preconizada para isolar estas células.

As células com morfologia semelhante à célula mesenquimal eram predominantes em número nas células derivadas do saco vitelino, fígado e medula óssea. Estas células variam quanto ao tamanho e principalmente quanto à proporção núcleo

citoplasma, seu citoplasma era granuloso, conferido pela presença de organelas citoplasmáticas como mitocôndrias e aparato de Golgi e vacúolos de nitrogênio, semelhante ao citado Tagami et al. (2003).

Os resultados ultraestruturais das células da medula óssea revelaram a presença de células semelhantes a monócitos. Isto pode ser consequência do método de isolamento adotado, pois não utilizamos processos de separação de células mononucleares, o que resulta na contaminação da cultura por outros tipos celulares indesejáveis presentes na medula óssea, como monócitos. Os monócitos derivados do cultivo da medula óssea de fetos caninos ultraestruturalmente assemelham aos monócitos de cães adultos. Ambos são grandes com formato variável, possuem o núcleo lateralizado e longos pseudópodes. As organelas identificadas neste tipo celular são: vacúolos de glicogênio, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e lisossomos (SAMUELSON, 2007).

Comparativamente a caracterização morfológica (ultraestrutural) das células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea, a análise imunofenotípica revelou uma heterogeneidade em relação aos marcadores para as células mesenquimais, progenitores epiteliais e hematopoiéticos a células pluripotentes, tais como anticorpos monoclonais contra: Oct-3/4, nestina, vimentina, citoqueratina-18, ve-caderina, CD13 e CD45. Essa diversidade imunofenotípica na expressão dos marcadores deve se ao método de isolamento, pois não utilizamos nenhuma técnica de seleção, e ao fato que o feto esta em fase exponencial de crescimento necessitando uma variedade celular para o rápido desenvolvimento. Para estabelecer as culturas utilizamos diversos meios que foram escolhidos empiricamente, pois não há trabalhos referentes ao isolamento destes tipos celulares na espécie canina. Portanto diferenças nas condições de cultivo também podem influenciar tipos das células isoladas (DAZZI et al., 2006).

Uma pequena população de células Oct3/4 positivas foi detectada nas células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea. Este fator de transcrição é expresso nas fases iniciais do desenvolvimento (mórula, blastocisto) e está relacionado com a manutenção de pluripotencialidade, das células embrionárias (PESCE et al., 2001). Sabe-se que nestas células o Oct3/4 localiza se especificamente no núcleo. Em contraste às células-tronco embrionárias observamos a localização intracitoplasmática

deste marcador nas células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea. Nas células progenitoras do saco vitelino a expressão ocorreu ou na região perinuclear ou nas regiões perinuclear e citoplasmática. Nas células progenitoras do fígado a expressão do Oct-3/4 foi: nuclear, perinuclear, ou perinuclear e citoplasmática. Nas células progenitoras da medula óssea a expressão de Oct3/4 foi observada na região perinuclear. De acordo com o conhecimento atual, a marcação que observamos foi encontrada nas células com características germinativas, que são também células precursoras (MIKI et al 2006).

De acordo com nossos resultados as populações celulares positivas para oct-3/4 foram identificadas em outras células-tronco ou progenitores tecido- específicas isoladas de polpa dentária (KERKIS et al., 2006), medula óssea (KUCIA et al., 2006), epiderme (HU et al., 2003), epitélio bronquial (LING et al., 2006), miocárdio (MENDEZ et al., 2006), pâncreas (KRUSE et al., 2006); e em tecidos fetais como membrana amniótica (MIKI et al., 2006), cordão umbilical (KUCIA et al., 2007) que também apresentaram localização intracelular variável.

Nestina é uma proteína de filamento intermediário, que se expressa também durante o período embrionário nas células progenitoras de linhagens mesenquimais e neuroectodermal (ANDRESSEN et al, 2001; WIESE et al., 2004; LOBO et al., 2004; WIESSE et al., 2004;). A diferenciação celular envolve reestruturação do citoesqueleto celular que no início do desenvolvimento embrionário é composto principalmente por nestina (LI et al., 2003). Esta proteína foi identificada em altos níveis nas células progenitoras da medula óssea e em menor proporção nas células progenitoras do saco vitelino e fígado de fetos de cães. A expressão de nestina também foi observada por Nagai et al. (2007) nas células da medula óssea fetal humana e nas células do folículo piloso (LI et al., 2003). Adicionalmente nos encontramos a expressão de nestina nas células progenitoras do saco vitelino e fígado. Atualmente não há trabalhos que reportam a sua expressão nestas células progenitoras.

Vimentina é outra proteína de filamento intermediário que marca células de origem mesenquimal (IVASKA et al., 2007) e foi que encontrado nas células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea. Quando comparada a expressão do anticorpo vimentina entre os três tecidos fetais, verificou-se uma alta expressão de

vimentina nas células progenitoras da medula óssea, em comparação as células progenitoras do saco vitelino e fígado. Chargraoui et al. (2003) identificou células positivas para vimentina em fígado fetal de camundongos, porém este mesmo tipo celular expressava concomitantemente desmina. Os autores classificaram este tipo celular como células transitórias de origem epitelial-mesenquimal. Esta célula é encontrada somente na fase eritropoética do fígado fetal, colaborando com os eventos hematopoiéticos e gerando células-tronco mesenquimais e endodermis.

A citoqueratina-18 também é uma proteína do filamento intermediário. Este marcador representa a transição entre células epiteliais e mesenquimais. No fígado a expressão de citoqueratinas já foi bem reportada por Dabeva et al. (2003) para célula hepática oval e Shiojiri et al., (1991), para os hepatoblastos fetais. Nenhum trabalho mostrou a expressão da citoqueratina nas células progenitoras do saco vitelino e medula óssea de fetos caninos que nos detectamos.

Ao verificarmos a expressão de marcadores endoteliais (ve-caderina) e hematopoiéticos (CD45 e CD13) nas células progenitoras identificamos a expressão da proteína ve-caderina somente nas células progenitoras do saco vitelino. Este resultado já era esperado, uma vez que este marcador é expresso durante vasculogênese e nas progenitoras mesodermis durante a diferenciação para as células endoteliais (BRIER et al., 1996; NISHIKAWA et al., 1998), o que é justificado pela função hematopoiética da membrana vitelínica, (AUERBACH et al., 1998). Muitos trabalhos estudaram o potencial hematopoiético da membrana vitelínica, como demonstrado por: Corn et al., (1991); Auerbach et al., (1998); Medvinsky et al., (1999); Surbek et al., (2001); Jafredo et al., (2005);. De acordo com nossos dados a expressão de marcadores hematopoiéticos nas células precursoras do saco vitelino de fetos humanos não foi encontrada (WANG et al., 2008).

Realizamos a citometria de fluxo para verificar a expressão de anticorpos mesenquimais e hematopoiéticos humanos (CD44, CD90, CD29, CD13, CD14, CD31, CD45, e CD117) nas células progenitoras da medula óssea. Os resultados revelaram a imunopositividade somente para o anticorpo CD44. Esta proteína participa das interações entre a matriz e célula e também entre célula-célula, o que foi demonstrado para células mesenquimais de medula óssea adulta, (PITTENGER et al., 1999; SEO et

al., 2004), de medula óssea fetal, (CAMPAGNOLI et al., 2001; GOTHERSTROM et al., 2005), do fígado fetal (GOTHERSTROM et al., 2005; DAN et al., 2006) e do saco vitelino (WANG et al., 2008).

As células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea foram submetidos aos ensaios de diferenciação em tecidos: ósseo, adiposo, cartilaginoso e muscular. Células indiferenciadas são utilizadas para a diferenciação utilizando os meios de cultura específicos enriquecidos com agentes indutores, por um determinado período de tempo (7 a 21 dias) (PITTENGER et al., 1999).

Alguns autores relatam que a via padrão de diferenciação das células-tronco isoladas da medula óssea é a osteogênica. As células-tronco mesenquimais estão mais predispostas a produzirem nódulos ósseos ricos em proteoglicanas do que os vacúolos lipídicos da via adipogênica ou os glicosaminoglicanas da condrogênica (BANFI et al., 2000; JAVAZON et al., 2004; DAZZI et al., 2006). Este conceito é compatível aos resultados obtidos para as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea.

A diferenciação osteogênica foi observada nas três culturas de células progenitoras, enquanto a condrogênica somente para as células progenitoras do saco vitelino e medula óssea. A diferenciação adipogênica não ocorreu em nenhuma cultura celular. As células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea ao serem induzidas à diferenciação osteogênica apresentaram resultados semelhantes aos demonstrados para células mesenquimais do cordão umbilical de cães (SEO et al., 2009; ZUCONNI et al., 2009) e para células da medula óssea de cães adultos (CZAKY et al., 2007). Vale salientar que o meio de cultivo osteogênico utilizado pelos autores, bem como o período de manutenção da diferenciação foram os mesmos adotados nesta pesquisa.

Durante o processo de diferenciação osteogênica as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea modificaram morfológicamente, adquiriram um formato achatado e citoplasma esparso com granulosidades. Os resultados semelhantes, porém utilizando o método de microscopia eletrônica de transmissão foram demonstrados para diferenciação osteogênica das células da medula óssea de cães adultos, que também demonstrou a granulosidade através da presença de

mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e aparato rugoso. (CZAKY et al., 2007) Torna-se importante ressaltar que a mineralização ocorreu de forma mais rápida e mais intensa a partir das células progenitoras do fígado quanto comparadas as células do saco vitelino e medula óssea.

Comprovamos a diferenciação osteogênica utilizando os marcadores específicos para osteoblasto, tais como osteocalcina (LF32) e sialoproteína nas células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea. O resultado obtido esta de acordo com os resultados para as células mesenquimais da medula óssea de cães adultos (CZAKY et al., 2007).

Ao realizar os ensaios de diferenciação condrogênica nas células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea foram observados a formação de uma micromassa celular somente a partir das células progenitoras do saco vitelino e medula óssea. Da mesma forma, a diferenciação condrogênica ocorreu nas células mesenquimais de origem fetal do cordão umbilical de cães (SEO et al., 2009; ZUCONNI et al., 2009), e para células mesenquimais da medula óssea de cães adultos (CZAKY et al., 2007).

A formação da micromassa celular ocorreu após 24 horas, assim como para as células mesenquimais da medula óssea adulta de cães adultos (CZAKY et al., 2007). No entanto o período experimental para a diferenciação condrogênica para células mesenquimais de medula óssea de cães adultos foi de 14 dias (CZAKY et al., 2007 e NEUPANE et al., 2008) enquanto para células progenitoras do saco vitelino e medula óssea, assim como para células de cordão umbilical foi de 21 dias (SEO et al., 2009; ZUCONNI et al., 2009). O período necessário para a diferenciação pode estar relacionado à origem das células, ou seja, células mesenquimais de tecidos adultos diferenciam mais rápido por estarem mais comprometidas a determinadas linhagens celulares, enquanto que as células embrionárias bem como fetais são mais imaturas. A micromassa celular das células progenitoras do saco vitelino e medula óssea derivadas da diferenciação condrogênica foram positivas para coloração de Azul de Toluidina, como demonstrado pelas células mesenquimais da medula óssea de cães adultos (CZAKY et al., 2007), e do cordão umbilical (SEO et al., 2009; ZUCONNI et al., 2009). A análise da ultraestrutural da diferenciação condrogênica a partir das células

mesenquimais da medula óssea de cães adultos revelou a organização morfológica do nódulo condrogênico, que era rico em fibras colágenas organizadas sob forma de nódulos (CZAKY et al., 2007). Estes achados assemelham-se aos encontrados para a diferenciação celular condrogênica obtida a partir das células progenitoras do saco vitelino e medula óssea. As fibras colágenas bem como os nódulos cartilaginosos foram observadas a partir da técnica de Tricromo de Masson e Pricosirius. O nódulo condrogênico derivado das células progenitoras da medula óssea de fetos de cães foi positivo para colágeno tipo II. Estes dados também foram demonstrados para células mesenquimais do cordão umbilical de cães (SEO et al., 2008; ZUCONNI et al., 2009) e células mesenquimais da medula óssea de cães adultos (CZAKY et al., 2007). A expressão de agrecan foi evidenciada na diferenciação condrogênica das células do saco vitelino. Da mesma forma que foi observada nas células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (SEO et al., 2008; ZUCONNI et al. 2009).

Ao induzimos a diferenciação miogênica observamos que as células progenitoras da medula óssea adquiriram a orientação e morfologia de células musculares (células longilíneas orientadas paralelamente umas as outras), assim como a fusão celular sugerindo o início de formação dos miotubos. Estas células foram imunopositivas para o anticorpo alfa-actinina sarcomérica. Resultados semelhantes aos obtidos para as células progenitoras do saco vitelino e fígado de fetos caninos. Em relação à diferenciação miogênica há poucos trabalhos na literatura. Células Oct3/4 e vimentina positivas do líquido amniótico de humanos foram capazes de diferenciar em células musculares. Estas células após a diferenciação apresentaram fenótipo miogênico através da expressão de desmina e myoD (GEKA et al., 2009).

As células progenitoras da medula óssea fetal imunopositivas para o anticorpo nestina após a indução neuronal (meio neurobasal suplementado com B27) adquiriram morfologia neuronal sugerindo o potencial neurogênico destas células. Resultados discrepantes foram obtidos a partir das células mesenquimais do cordão umbilical de cães. Estas células não eram nestina positivas, que é uma proteína dos progenitores neuronais, no entanto ao induzir à diferenciação as mesmas foram imunopositivas para nestina e para marcadores neurais como *GFAP*, *Tju-1* e *NF160* (SEO et al., 2009).

As células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea não foram capazes de diferenciarem para gordura ao utilizarmos os meios de cultivo já estabelecidos para induzir a diferenciação. Nestas condições, as células mesenquimais da medula óssea cães foram capazes de diferenciar em células adipogênicas (CZAKY et al., 2007).

O objetivo de estudos das células-tronco é a sua futura utilização na terapia celular. Um dos pré-requisitos para a utilização das células-tronco na terapia celular é serem normais e o potencial de diferenciação em diferentes tipos celulares. Demonstramos que as células progenitoras do saco vitelino, fígado e medula óssea apresentam o cariótipo normal e estável após cultivo *in vitro*. Importante ressaltar que elas também não apresentam potencial teratogênico *in vivo*, e demonstraram o potencial de diferenciação *in vitro*. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que células progenitoras fetais possam ser indicados para serem testados na terapia celular em cães. Por outro lado podemos explorar o potencial terapêutico destas células em modelos pré-clínicos. Os resultados que irão ser obtidos poderão ser extrapolados na modelagem do potencial das células-tronco fetais humanas e sua aplicação clínica. No entanto, vários estudos necessitam ser realizados, tais como a verificação de expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC classes I e II), e a completa avaliação da plasticidade destas células. Além de questões relacionadas às características biológicas e terapêuticas das células-tronco como: o direcionamento das células-tronco a uma linhagem celular específica, o cultivo celular livre de SFB e a obtenção do número desejado para terapia. Mesmo assim a medicina regenerativa com a utilização de célula-tronco desponta como uma ferramenta terapêutica promissora no tratamento de uma variedade de doenças e distúrbios, para as quais ainda não há disponível na atualidade, tratamento específico ou efetivo (KASSEM et al., 2004).

10 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstra que foram estabelecidos critérios para o isolamento e o cultivo de células progenitoras de fetos caninos morfologicamente semelhantes a células-tronco mesenquimais e imunofenotipicamente heterogêneas. Tais células progenitoras (saco vitelino, fígado e medula óssea) não induziram a formação de tumores e mantiveram o cariótipo estável após cultivo *in vitro* e demonstraram distinto potencial de diferenciação entre os diferentes tecidos fetais. Sendo assim, estas células seriam possíveis candidatas a utilização em terapia celular.

1-Com base no desenvolvimento embriológico-fetal, a idade fetal adequada para o isolamento de células progenitoras dos tecidos fetais variou: do saco vitelino vai do 15º ao 30º dia de gestação; enquanto que o fígado fetal o período ideal vai do 15º ao 40º dia de gestação, e medula óssea o período ideal vai do 50º ao 60º dia de gestação.

2-O meio de cultivo adequado para o isolamento e expansão de células progenitoras dos tecidos fetais caninos foi o meio de cultivo Alfa-MEM suplementado com SFB-Hyclone, 1% de aminoácido não essencial, glutamina e antibiótico.

3-Ao serem analisadas morfologicamente e imunofenotipicamente sugere a presença de células progenitoras mesenquimais e epiteliais

4-As células progenitoras da medula óssea demonstraram maior potencial de proliferação e diversidade de diferenciação, quando comparada às células progenitoras do saco vitelino e fígado.

5-As células progenitoras derivadas do saco vitelino, fígado e medula óssea apresentaram características morfológicas, ultraestrutural, imunofenotípica e de plasticidade semelhante às células-tronco mesenquimais.

6- Dentre as células progenitoras fetais caninas as células progenitoras da medula óssea são as mais similares as células-tronco mesenquimais.

Referências

- ALISON, M.R.; GOLDING, M.H.; SARRAF, C. E. Pluripotence liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. **Cell Proliferation**, v.29, p.373-402, 1996
- ANDREA, K.; VAAGS, CATHY, J.; GARTLEY, Y.; ZHEN ZHENG, ALDEN, C.; DANIEL, A. F.; VILLAGÓMEZ, S A.; KRUTH, M. R.; HOUGH. Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. **Stem cells**, v. 27, n. 2, p. 324- 340, 2009.
- ANDRESSEN, C.; STOCKER, E.; KLINZ, F. J.; LENKA, N.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.; ARNHOLD, S.; ADDICKS, K. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. **Stem Cells**, v. 19, p. 419–424, 2001.
- ANJOS-AFONSO, F.; BONNET, D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1_ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. **Blood**, v. 109, p. 1298–1306, 2007.
- ARENDS, B.; VANKELECOM, H.; BORGHT, S. V.; ROSKAMS, T.; PENNING, L. C.; ROTHUIZEN, J. The dog liver contains a "side population" of cells with hepatic progenitor-like characteristics. **Stem cells and Development**, v.18, n. 2, p. 343-350, 2008.
- AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**, v.14, p .269-1820, 1996.
- BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of *ex vivo* expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experimental. Hematology**, v. 28, n. 6, p. 707-715, 2000.
- BARRY, F. P.; BOYNTON, R. E.; HAYNESWORTH, S.; MURPHY, J. M.; ZAIA, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). **Biochemical. Biophysical. Research. Communication**, v. 265, n. 1, p. 134-139, 1999.
- BELTRAMI, A.P.; CESSSELLI, D.; BERGAMIN, N. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). **Blood**, v. 110, p. 3438–3446, 2007.
- BEYER N. N.; DA SILVA MEIRELLES L. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook Experimental Pharmacolog**, .v. 174, p.249 –282, 2006

BIANCO, P.; COSSU, G. Uno, nessuno e centomila: Searching for the identity of mesodermal progenitors. **Experimental Cell Research**, v. 251, p. 257–263, 1999

BLOMHOFF, R. M. H; GRANDEN, T.; BERG, E K. R. NORUM. Transport e storage of vitamin A. **Science**, v. 250, p. 399-404, 1990

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal Cell Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 278-294, 1997.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641–650, 1991.

CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Molecular Medicine**, v. 7, p. 259 –264, 2001.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cell: cell-based reconstructive therapy in orthopaedics. **Tissue Engineering**. v. 11, p.1198, 2005.

CSAKI, C.; MATIS, U. A.; MOBASHERI, H. YE.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemical Cell Biology**, v. 128, p. 507–520, 2007.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of the National Academic Sciences of United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3213-3218, 2000.

DA SILVA M, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, p.119, 2006.

DAZZI, F.; RAMASAMY, R.; GLENNIE, S.; JONES, S. P.; ROBERTS, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 161-171, 2006.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DEXTER, T.M.; ALLEN, T. D.; LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells *in vitro*. **Journal Cell Physiology**, v.91, p. 335-344, 1977.

DIGIROLAMO, C. M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D. G.; CLASS, R.; PROCKOP, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to

propagate and differentiate. **British Journal Haematology**, v. 107, n. 2, p. 275-281, 1999.

D'IPPOLITO, G.; DIABIRA, S.; HOWARD, G.A.; MENEI, P.; ROOS, B.A.; SCHILLER, P.C. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. **Journal Cell Science**, v. 117, p. 2971–2981, 2004.

FAGUNDES, D.; JOSÉ, T.; MURCHED, O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n. 1, 2004

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Exp. Gerontology**, 2005.

FINE, A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview. **Canadian Medical Association Journal**, v.15, n. 9, p.1261-1268, 1994.

FLAKE, A.W. Zanjani, E.D. In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. **Journal Association Medical American**, v. 278, p. 932-7, 1997

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetic**, v.3, p.393–403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FRIEDENSTEIN, A.J, PETRAKOVA, K.V, KUROLESOVA, A.I, FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6:p.2 30–247, 1968.

FUCHS, J.R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, S.; VACANTI, J.P.; FAUZA, D.O. Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow. mesenchymal progenitor cells. **Journal Pediatric Surgical**, v. 38, n. 6, p. 984-987, 2003.

FUNK ,P.E.; STEPHAN, R.P.; WITTE, P.L. Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow. **Blood**, v 86, p. 661–267, 1995.

GAGE, F.H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GANG, E.J.; BOSNAKOVSKI, D.; FIGUEIREDO, C.A. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. **Blood**, v. 109, p. 1743–1751, 2007

GEKAS, J.; WALTHER, G.; SKUK, D.; BUJOLD, E.; HARVEY, I.; BERTRANDIN, O. F. Vitro and in vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage. **Clinical Experimental Medicine**. 2009.

GLOBERSON, A.; WOODS, V.; ABEL, L.; MORRISSEY, L.; CAIRNS, J. S.; KUKULANSKY, T.; KUBAL, L.; AUERBACH, R. In vitro differentiation of mouse embryonic yolk sac cells. **Differentiation**, v. 36, p.185-93, 1987.

GODIN, I. E.; GARCIA-PORRERO, J. A.; DIETERLEN-LIÈVRE, F. Potential intraembryonic hemogenic sites at pre-liver stages in the mouse. **Anatomical Embryology (Berl)**, 192(5):425-35, 1995.

GRONTHOS, S; P. SIMMONS. 1996. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. **Journal Hematology**, v.5 p.15, 1996.

GUILLOT P.V.; ABASS, O.; BASSETT, J.H; SHEFELBINE, S.J.; BOU-GHARIOS, G; CHAN, J.; KURST, H.; WILLIAMAS, G.R.; FISK, N.M. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. **Blood**, v.1, 11, n. 3, p.1717-25, 2008.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, M.; REYES-MALDONADO, E.; MAYANI, H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 18, n. 1, p. 46-52, 2000.

HAFES, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAYNESWORTH, S. E.; BARBER, I. A.; CAPLAN. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone** .v.13, p. 69–80, 1992.

HIRSCHI, K.K; D'AMORE, P.A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, v.32, p.687– 698,1996.

HORN, P.A.; MORRIS, J.C.; NEFF, T.; KIEM, H.P. Stem cell gene transfer—efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, v. 10, p. 417–43, 2004.

IN 'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN, KC.; NOORTWA, CF.; WILLEMZE, FILBE, W.E.; KANAHSI, H, H.. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v. 102, p. 1548–1549, 2003.

IVASKA, J.; PALLARI, H.M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J.E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental. Cell Research**, v. 313, p. 2050–2062, 2007.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 5, p. 414-425, 2004

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic Clinical. Pharmacology.Toxicology**. v. 95, n. 5, p. 209-214, 2004.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS GC.; GOMES, M.S.M; PEREIRA, LV.; CAPLAN, AI.; CERRUTI HF. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v.1 84, p. 105-16 2006.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. 204, 2007.

KRUSE, E.; KAJAHAN, J.; PETSCHNIK, A.E.; MAASS, A.; KLINK, E.; RAPOPORT, D.H. Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratomas-like structures. **Annals Anatomic**, v. 188, p. 503-517, 2006.

KUBOTA, H.; REID, L. M. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. **Proceedings of the National Academic Sciences USA**, v. 97, p. 12132–12137, 2000.

KUCIA, M.; HALASA, M; WYSOCZYNSKY, BASKIEWICZ-MASIUK, ZUBA-SURMA. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4=SSEA-4+ very small embryonic-like (vsel) cells purified from human Cord blood- preliminary report. **Leukemia**, v. 21, p. 297-303, 2007.

KUCIA, M; RECA, R.; CAMPBELL, FR. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(p)SSEA-1(p)Oct-4p stem cells identified in adult bone marrow. **Leukemia**, v.20, p. 857–869, 2006.

KUCIA, M.; RECA, R.; JALA, VR.; DAWN, B.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, MZ. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. **Leukemia**, v. 19, p. 1118–1127, 2005.

KUO, M. Y.; LAN, W. H.; LIN, S. K.; TSAI, K. S.; HAHN, L. J. Collagen gene expression in human dental pulp cell culture. **Archives. Oral Biology**, v. 37, p. 945–952, 1992.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, v. 19, n. 1, p. 29-38, 2005.

LE BLANC, K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. **Cytotherapy**, v.8, p.559 –561, 2006.

LI, L.; MIGNONE, J.; YANG, M.; MATIC, M.; PENMAN, S.; ENIKOLOPOV, G.; Hoffman, R.M. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. **Proceedings of the National Academics Sciences USA**, v. 100, p. 9958–9961, 2003.

LING, T. Y.; KUO, M. D.; L. I, CLARK, J.; BURDON, T. Identification of pulmonaryoct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. **Proceedings of the National Academics Sciences USA**, v. 103, p. 9530-9535, 2006.

LIU, C. P.; AUERBACH, R. In vitro development of murine T cells from prethymic and pre-liver embryonic yolk sac hematopoietic stem cells. **Development**, v. 113, p. 1315-23, 1991.

LOBO, M.V.; ARENAS, M.I.; ALONSO, F.J.; GOMEZ, G.; BAZAN, E.; PAINO, C.L.; FERNANDEZ, E.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R.; MOYANO, A.; CASO, E. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in Leydig cells of the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. **Cell Tissue Research**, v. 316, p. 369–376, 2004

LORÉAL, O., B. CLÉMENT, D. SCHUPPAN, P. Y. RESCAN, M. RISSEL, E A. GUILLOUZO. Distribution e cellular origin of collagen VI during development e in cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 102, p. 980-987, 1992.

MANISH N.; D.V.M.; CHIA-CHENG, C.; MATTI KIUPEL, D.V.M.; VILMA, YUZBASIYAN-GURKAN. Isolation and Characterization of Canine Adipose–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 14, p.2008.

MITSIADIS, T. A.; BARRANDON, O.; ROCHAT, A.; BARRADON, Y.; DE BARI, C. Stem cell niches in mammals. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 16, p. 3377–3385, 2007.

MOORE; METCALF .Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo e in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **British Journal Haematology**, v.18, n. 3, p. 279-96, 1970.

NOMURA, R. M.; MIYADAHIRA, S.; FRANCISCO, R. P.; OKATANI, D.; ZUGAIB, M. Assessment of fetal maturity in high risk pregnancies: analysis according to gestational age. **Revista Associação Médica Brasileira**. v. 47, p. 346-51, 2001.

PARK, J. S.; KIM, H. Y.; KIM, H. W.; CHAE, G. N.; OH, H. T.; PARK, J. Y.; SHIM, H.; SEO, M.; SHIN, E. Y.; KIM, E. G.; PARK, S. C.; KWAK, S. J. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells. **Mechanisms. Ageing Development**, v. 126, n. 5, p. 551-559, 2005.

PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, v. 19, p. 271–278, 2001.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p.143-147, 1999.

PINZANI, M. Hepatic stellate (ITO) cells: Expanding roles for a liver specific pericyte. **Journal Hepatology**, v. 22, p.700–706, 1995.

PHINNEY, D. G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal Cell Biochemistry Supplement**, v. 38, p. 7–12, 2002.

RAMADORI, G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver: New insights into pathophysiology of an intriguing cell. **Virchows Archiv [B]**, v. 61, p. 147-158, 1991

RATAJCZAK, M. Z.; MACHALINSKI, B.; WOJAKOWSKI, W.; RATAJCZAK, J.; KUCIA, M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4⁺ stem cells in adult bone marrow and other tissues. **Leukemia**, v.21, p.860–867, 2007.

SAMUELSON, D. A. **Textbook of veterinary histology**. St. Louis. Mo: Saunders Elsevier, 2007.

SEO, M.; JEONG, Y.; PARK, J.; PARK, S.; RHO, K. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal Veterinary Science**, v. 10, p. 181-187, 2009.

SEKIZAWA, A.; JIMBO, M.; SAITO, H.; IWASAKI, M.; MATSUOKA, R.; OKAI, T. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 188, p. 480-4, 2003.

SESHI, B.; KUMAR, S.; SELLERS, D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. **Blood Cells Molecular Disease**, v. 26, p. 234-46, 2000.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; BRAUN, J.; KOLB, H.; ADLER, H. Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 17, 2008.

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

SURBEK, D.; V.; Holzgreve, W.; Nicolaidis, K.. Hematopoietic stem cell transplantation and gene therapy in the fetus: ready for clinical use? **Human Reproduction**, v.7, p. 85-91. 2001.

TABBAL, S.; FAHN, S.; FRUCHT, S. Fetal tissue transplantation [correction of transplanation] in Parkinson's disease. **Current Opinion Neurology**, v. 11, p. 341-9, 1998.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M.; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Research**, v. 312, p. 31-40, 2003.

TAKASHIMA, Y.; ERA, T.; NAKAO, K. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. **Cell**, v.129, p.1377–1388, 2007.

TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFTE, M.; DELFORGE, A.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.6, n.4, p.372-379, 2004.

VAN ZWIETEN, M. C.; WILLEMS, D. L.; LITJENS, L. L.; SCHURING-BLOM, H. G.; LESCHOT, N. How unexpected are unexpected findings in prenatal cytogenetic diagnosis? A literature review. **European Journal Obstetrics Gynecology Reproduction Biology**, v.120, p.15-21, 2005.

VERFAILLIE, C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

ZHANG, M.; MAL, N.; KIEDROWSKI, M.; CHACKO, M.; ASKARI, A. T.; POPOVIC, Z. B.; KOC, O. N.; PENN, M. S. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. **FASEB Journal**, v.21, p.3197–3207, 2007.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JONHNSON, T.; FENG, J. O.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v.425, p.836–841, 2003.

ZUBA-SURMA, E. K.; KUCIA, M.; ABDEL-LATIF, A. Morphological characterization of Very Small Embryonic-Like stem cells (VSELs) by ImageStream system analysis. **Journal Cell Molecular Medicine**, v.12, p.292–303, 2008.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering** v.7, p.211–228, 2001.

YU, H.; FRAND, D.; KUMAR, S. M.; LI, L.; NGUYEN, T. K. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. **Amercian Journal Pathology**, v.168, p.1879-1888, 2006.

WAGNER, J. E.; KERNAN, N. A.; STEINBUCH, M.; BROXMEYER, H. E.; GLUCKMAN, E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, p.214-9, 1995.

WIESE, C.; ROLLETSCHEK, A.; KANIA, G.; BLYSZCZUK, P.; TARASOV, K. V.; TARASOVA, Y.; WERSTO, R. P.; BOHELER, K. R.; WOBUS, A. M. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? **Cell Molecular Life Science**, v.61, p.2510–2522, 2004.

WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; NING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **Brisht . Journal Haematol.** v. 121, n. 2, p. 368-374, 2003.

WILCOX, J. T.; ESTHER, S.; BRISSON, B. A.; PERRAULT, S. D.; VILLAGÓMEZ, D. A. F.; TAYADE, C.; BECKER, S.; LANZA, R.; BETTS, D. H. Characterization of Canine Embryonic Stem Cell Lines Derived From Different Niche Microenvironments. **Stem cells and development**, v. 18, 2009.

WILSON, J.W.; GROAT, C.S.; LEDUC, E.H. Histogenesis of the liver. **Annals, New York Academic Science NY, Academic Science**, v.111, p. 8-24, 1963.

WILSON, A.; OSER, G. M.; JAWORSKI, M, BLANCO-BOSE, W. E.; LAURENTI, E.; ADOLPHE, C.; ESSERS, M. A.; MACDONALD, H. R.; TRUMPP, A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. **Annals Academic New York Acad Science**, v.1106, p .64 –75, 2007.