ANA LUISA REGINATO

**Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana
(CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (*Canis lupus familiares*)**

São Paulo

2012

ANA LUISA REGINATO

Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana (CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (*Canis lupus familiares*)

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. Irina Kerkis

São Paulo

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
7/5/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2506
FMVZ

Reginato, Ana Luisa

Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana (CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (*Canis lupus familiares*) / Ana Luisa Reginato.-- 2012.
119 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Irina Kerkis.

1. Célula tronco mesenquimal. 2. Endereçamento (Homing) celular. 3. Tráfego celular. 4. Medicina fetal. 5. GFP (green fluorescent protein). I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

Of. CEUAVET nº 215/FMVZ/2011
lfrs

São Paulo, 21 de outubro de 2011.

À senhora

Profa. Dra. Irina Kerkis

Orientadora do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres – FMVZ/USP

Assunto: **Protocolo nº 2267/2011, intitulado “Estudo da bio-distribuição de células tronco da polpa de dente imaturo humana através do transplante intra-uterino em modelo canino (*Canis lupus familiaris*)”**

Prezada Professora,

Informamos que, após o recebimento do parecer do consultor *ad hoc*, bem como da análise da documentação encaminhada em 29/8/2011, a Comissão de Ética no uso de Animais desta FMVZ/USP manifestou-se favoravelmente à aprovação do projeto supracitado.

Atenciosamente,

Denise Tabacchi Fantoni

Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: REGINATO, Ana Luisa

Título: Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana (CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (*Canis lupus familiares*).

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

DEDICATÓRIA ESPECIAL

*"Ora (direis) ouvir estrelas!
Certo, Perdeste o senso!"
E eu vos direi, no entanto,
Que, para ouvi-las, muita vez desperto
E abro as janelas, pálido de espanto...*

*E conversamos toda a noite, enquanto
A via láctea, como um pátio aberto,
Cintila. E, ao vir do sol, saudosos e em pranto,
Inda as procuro pelo céu deserto.*

*Direis agora! "Tresloucado amigo!
Que conversas com elas? Que sentido
Tem o que dizem, quando estão contigo?"*

*E eu vos direi: "Amai para entendê-las:
Pois só quem ama pode ter ouvido
Capaz de ouvir e de entender estrelas".
"Olavo Bilac"*

Dedico, a memória de mãe, **Zuleika Girardi Rosa Reginato**, tão querida, dedicada, exemplo do amor incondicional... Ensinou-me a olhar a vida com compaixão, com coragem, *como ouvir as estrelas*, com Deus...

A memória de meu irmão, **Luiz Eugênio Reginato Filho**, símbolo de criatividade e generosidade, alguém tão “tresloucado” que brilhou pela vida, como estrelas...

Ao meu pai, **Luiz Eugênio Reginato**, um guerreiro fiel, símbolo do trabalho com dignidade;

E ao meu filho, **Pedro**, instrumento da “verdade”, da razão de viver, do ar que respiro, dedico a ele, o fruto do amor, pelo tempo que lhe foi tirado, meu exemplo de coragem e sabedoria; e ao **Milson Sousa Junior** que tanto me ensinou, compartilhou... pelos anos vividos com amor e dedicação, a quem me presenteou nosso tão amado filho...

Ao meu irmão **Antônio Luis Reginato** estrela brilhante, que tenho profundo respeito e carinho, símbolo da determinação; e a sua esposa **Ediliz Reginato** estrela que se uniu... Aos meus sobrinhos: **Luiz, Mateus, Luiz Francisco e João** a continuação da família, que eu possa de alguma forma dar-lhes o exemplo de amor, caráter, dignidade... E quem sabe, ensinar-lhes a “... ter ouvido, capaz de ouvir e entender estrelas...”

Ao amor, **Luiz Augusto Franco da Rocha**, estrela guia que surgiu, iluminou meu caminho e me trouxe um sentido para continuar acreditando que amar transforma!!

Muito Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*“De tudo, ficaram claramente 3 coisas:
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos,
Fazer da interrupção um novo caminho...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...”*

“Fernando Sabino”

Agradeço a Deus, ao Universo que possibilita tudo!!

Quero agradecer a **Prof. Dra. Irina Kerkis**, minha orientadora, antes de mais nada pela paciência que teve comigo, pelos ensinamentos e horas de leituras e discussões gastas neste trabalho, sempre úteis e bem-vindas que acabaram por constitui-lo; pela amizade e carinho em todos os momentos difíceis, pessoais ou técnicos. Também por abrir as portas de sua casa, onde me sinto como parte da família. Ao **Prof. Dr. Alexandre Kerkis** desvendando os segredos do microscópio Confocal, e acima de tudo, hoje um querido amigo que está sempre tentando colocar meus pés na terra!!

A **Prof. Dra. Maria Angélica Miglino**, a quem sou muito grata, que me acompanha desde o primeiro ano de faculdade, mostrando os caminhos da pesquisa, dividindo momentos de grande amizade, compartilhando a família, oferecendo oportunidades que construíram minha formação como Médica Veterinária, e mostrando, que sem disciplina não chegamos ao caminho da realização!!

A todos os professores do programa de pós-graduação **Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, Prof. Dra. Paula de Carvalho Papa, Prof. Dr. Carlos Ambrósio, Prof. Dra. Daniele Martins, Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr.** que mui generosamente dividem seus conhecimentos com todos os alunos, orientando e possibilitando nosso crescimento profissional. Ao querido **Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto**, carinhosamente “Nego”, que desde o mestrado me acompanha, incentiva e orienta minhas decisões. Valeu amigo!!

Ao **Prof. Dr. Durvaney Augusto Maria** do Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, e ao seu grupo: Kleber, Rose, Dyane, Álvaro...que nos ensinaram e atuaram ativamente na elaboração da metodologia e interpretação dos resultados

da Citometria de Fluxo; e pelo carinho dispensado a mim ao grupo da Prof. Irina Kerkis. Muito obrigada!

Aos **Prof. Dr. Paulo Mayorka e Dr. João Flávio Panattoni Martins** pela leitura e interpretação dos cortes histológicos pela Microscopia de Luz.

Aos **Prof. Tetsuo Yamane e Dr. Álvaro Rossan de Brandão Prieto da Silva** pesquisadores do Departamento de Genética do Instituto Butantan, pelos ensinamentos, carinho e amizade!!

AGRADECIMENTOS

*“... Já chamei pessoas próximas de "amigo", e descobri que não eram,
Algumas pessoas nunca precisei chamar de nada,
E sempre foram e serão especiais para mim....
Não me mostre o que esperam de mim, porque vou seguir meu coração!...
Não me façam ser o que não sou, **Não me convidem a ser igual,**
Porque sinceramente sou diferente!
Não sei amar pela metade, Não sei viver de mentiras.
Não sei voar (sonhar) com os pés no chão....
Sou sempre eu mesma,
Mas com certeza não serei a mesma para sempre....
Com o tempo aprendi que o que importa não é o que você tem na vida, mas
Quem você tem na vida....*

Coisas da Vida, de “Clarice Lispector”

...E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher. Gosto de cada um de vocês de um jeito especial e único...” portanto, dedico meu aprendizado, esforço, erros e acertos, tempo ganho e perdido- perdas pela ignorância e ganhos pela esperança, e acima de tudo, minha força de caminhar para frente... aos amigos que participaram deste trabalho:

A Cristiane Valverde Wenceslau, Cristina B.A. Faro, Renata A. Fernandes, Nelson F. Lisier, Rui Cosme Serafim, Simone Fonseca, Graciela Pignatari, Patrícia Beltrão-Braga, Matheus Feitosa e Kleber Ferreira ; que participaram deste trabalho ativamente, acreditaram que seria possível, estiveram ao meu lado. Quero dizer muito obrigado por tudo!!

Aos colegas e amigos do Canil GRMD Brasil: **Adriana “Drika”, Marina Brólio, Marina Britto, Taís, Karlinha, Dilayla, Daiane, Elaine, Carol, Greyson, Angélica, Leandro, Matheus...** que mui generosamente estiveram ao meu lado me apoiando e ensinando como lidar com nossos queridos e amados cães... E ao mesmo tempo, agiram com compaixão aos problemas pessoais que enfrentei no doutorado. Com muito carinho agradeço a todos!!

Aos colegas e amigos do Instituto Butantan: **Cristiane, Rui, Nelson, Lisley, Bruna, Babyla, Marília, Diana, Camila, Denner e Olga,** fundamentais neste trabalho e em todo o aprendizado que foi possível durante estes anos de convivência com vocês. Hoje acredito que é possível o trabalho em grupo, e que esta é sem sombra de dúvida a melhor forma de aprender: “Dividindo para somar conhecimento”. Adoro todos vocês!!!

Aos colegas e amigos da empresa Celltrovet: **Pavel Kerkis, Enrico Santos, Camila Kathiene, Michele Andrade de Barros, João Flávio P. Matins** e a caçula **Jessica**

Castanho, obrigada pela paciência e companheirismo, sou muito feliz por caminhar junto com vocês!!

Aos **técnicos e funcionários Maicon, Jackeline, Ronaldo; Diva, Angelina, Ivone**, que possibilitaram o bom andamento das aulas, apoio burocrático, métodos aplicados, sempre facilitando nossa vida no departamento. Muito obrigada!!

Faço um agradecimento especial ao amigo **Augusto**, funcionário do Canil, que do seu jeito possibilita cuidados especiais com os amados cães do Canil GRMD Brasil, facilita nosso trabalho e nos ensina o real sentido de determinação!!

Bom, não mais e nem menos, faço um agradecimento de coração e alma, a **Belinha e seus filhotes**, utilizados nesta pesquisa. Sem eles, nada haveria, por isso digo sem medo de errar, que a razão mostra a finalidade, e que a emoção traz o sentido, de tudo... Retribuo a eles com meu respeito e esforço para esta e outras pesquisas que viram graças a eles...

EPÍGRAFE

*“Somos as únicas criaturas na face da Terra, capazes de mudar nossa biologia pelo que
pensamos e sentimos!!*

*Nossas células estão constantemente bisbilhotando nossos pensamentos e estes, sendo
modificados por eles. Um surto de depressão pode arrasar seu sistema imunológico;
apaixonar-se, ao contrário, pode fortifica-lo tremendamente.*

A alegria e a realização nos mantém saudáveis e prolongam a vida...

Você se transforma na interpretação quando a internaliza“

Texto inspirado por Deepak Chopra

RESUMO

REGINATO, A. L. **Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana (CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (Canis lupus familiares).** [Biodistribution of human immature dental pulp stem cell (IDPSCs) after intra-uterine transplantation in canine model (Canis lupus familiares)]. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O transplante intrauterino de células-tronco (TIUCT) é um método de tratamento de doenças genéticas, congênitas, hematológicas e imunológicas em um feto durante a gestação. Em pesquisa básica este modelo permite o estudo da dinâmica de migração, enxertia e estado funcional de diferentes tipos de células-tronco (CT). Estas células podem ser transplantadas em diferentes momentos do período gestacional, que pode ser dividido em três momentos do desenvolvimento fetal, sendo estes, diferentes funcionalmente. A escolha deste momento para o transplante influenciará tanto no comportamento celular quanto no resultado. Para o TIUCT são utilizadas as CT mesenquimais derivadas da medula óssea ou fetais ou hematopoiéticas. Para esta pesquisa utilizamos células-tronco derivadas da polpa dentária imatura humana (CTIPDh) as quais apresentam potencial pluripotente e propriedades imunomodulatórias. Nosso principal objetivo foi avaliar a capacidade migratória, bem como de proliferação e endereçamento (“homing”) das CTIPDh durante o terceiro período gestacional do desenvolvimento fetal no modelo canino. Todos os procedimentos experimentais foram elaborados sob protocolo anestésico apropriado e aprovados pelo comitê de ética da FMVZ da USP. Foram transplantadas via intraperitoneal (IP) 1×10^6 CTIPDh GFP⁺ em cada feto, durante procedimento cirúrgico de laparotomia exploratória com ultrassonografia guiada intraoperatóriamente em quatro fetos com idade gestacional aproximada de 45 dias, e outros dois fetos os quais não receberam o transplante, utilizados como controle. Avaliamos os fetos pré e pós-transplante através do ultrasson. Após sete dias, realizamos a ovário-salpingo-histerectomia (OSH) para a colheita dos fetos. Em seguida coletamos seus órgãos e tecidos os quais foram fixados em paraformoldeído a 4% e criopreservados a temperatura de -80°C. Analisamos a biodistribuição das CTIPDh dentro dos órgãos e tecidos em criocortes de 5µm sob microscopia Confocal. Constatamos o “homing” das CTIPDh nos órgãos derivados das linhas germinativas endodermis, ectodermis e mesodermis. No estômago e intestinos as CTIPDh/GFP⁺ foram identificadas tanto no espaço intraglandular, como na camada muscular da mucosa; no fígado no parenquima hepático; no coração especialmente no tecido muscular do miocárdio; no cérebro nos vasos da substância branca, e cerebelo entre células de Purkinje.

Na placenta estas células foram encontradas especialmente junto aos vasos. Quantificamos as CTIPD GFP⁺ utilizando a citometria de fluxo. Comparativamente dentre os órgãos analisados, obtivemos resultados expressivos do “homing” celular no miocárdio (~50%), no baço e fígado. Nossos resultados foram confirmados através das análises de imunohistoquímica e imunofluorescência utilizando os anticorpos Anti-núcleo (HuNu), Anti-CTIPD e Anti-GFP humanos. Concluimos que as CTIPDh apresentam grande potencial migratório e proliferativo após o TIUCT em fetos caninos. Estas células indiferenciadas demonstraram homing, especialmente nos tecidos: hematopoiéticos fetais (placenta, fígado e baço), tecido epitelial e glandular de órgãos, bem como de nichos perivasculares de CT. Estes dados sugerem que as CTIPD através do TIU, é uma alternativa viável, segura e promissora para o tratamento de doenças genéticas, congênitas, hematológicas e imunológicas.

Palavras-chave: 1. Célula tronco mesenquimal. 2. Endereçamento (Homing) celular. 3. Tráfego celular. 4. Medicina fetal. 5. GFP (green fluorescent protein). 6. Modelo canino

ABSTRACT

REGINATO, A. L. **Biodistribution of human immature dental pulp stem cells following in utero transplantation in canine model (*Canis lupus familiaris*)**. [Estudo da biodistribuição de células tronco de polpa de dente decíduo humana (CTPDDh) após o transplante intra-uterino no modelo canino (*Canis lupus familiares*)]. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Intra-uterine stem cells transplantation (IUSCT) is a method for the treatment of genetic, congenital, hematological, and immunological diseases. In basic research it provides a model for studying the dynamics of migration, graft and functional status of different types of stem cells. The cells can be transplanted in different moments of gestational period, which can be divided into quarters that are not functionally equivalent. The choice of the cells and quarter where the stem cells will be applied can influence cells behavior and results of transplantation. Fetal and adult hematopoietic or bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) were mainly used for IUSCT. We previously obtained human immature dental pulp stem cell (IDPSCs), which showed pluripotent potential and immune-compatible properties. The goal of our study was to evaluate migration capacity, proliferation and homing of IDPSCs after IUSCT during the third fetal period in dogs. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University and were performed under appropriate anesthesia. 1×10^6 of undifferentiated GFP-positive human IDPSCs were transplanted following laparotomy and intraperitoneal injection under intra-operative ultrasound control into 5 fetuses at the 45 days of gestation. Five fetuses, which did not receive IDPSCs, were used as a control. Ultrasound analyses were performed daily before collection of the fetuses. After 7 days ovarian hysterectomy was performed, fetuses were collected; organs and tissues were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde or cryopreserved. Biodistribution of IDPSCs within the organs and tissues were analyzed on cryosections (5 μ m) under Confocal Microscopy. Homing of IDPSCs was observed in organs derived from three germ lines, endoderm, ectoderm and mesoderm. In stomach and in intestine GFP IDPSCs were found in intraglandular space as well as in muscularis mucosae. In liver they appeared in hepatic parenchyma; in heart in myocardium and in brain in blood vessels, in cerebellum within Purkinje cells. Using Flow cytometry assay GFP IDPSCs graft was quantified. Among the different organs an expressive homing was observed in myocardium of heart (~50%), in spleen and liver. The IDPSCs were also found in canine placenta, especially in blood vessels. These data were confirmed using anti-human nucleus (HuNu), anti-GFP and anti-IDPSCs anti-bodies. Human IDPSCs showed

high migration and proliferation potential after IUSCT in dog fetuses. Undifferentiated IDPSCs demonstrated homing in fetal hematopoietic (placenta), epithelial (gastric glands) and perivascular stem cells niches. Our data suggest that IDPSCs is a new promising source for genetic, congenital, hematological, and immunological treatment for those diseases through IUSCT.

Key-words: 1. Mesenchymal Stem Cell. 2. Stem Cell Homing. 3. Cell Traffking. 4. Fetal Medicine. 5. GFP (green fluorescent protein). 6. Canine Model

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO	21
2.1 CONCEITOS E DEFINIÇÕES	21
2.2 PLURIPOTÊNCIA E/OU PLASTICIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO	22
2.3 TRANSPLANTE INTRA-UTERINO (TIU) DE CÉLULA-TRONCO	26
2.3.1 TIU DE CTH OU EM COMBINAÇÃO COM CTM ISOLADAS DE TECIDOS ADULTOS E FETAIS	27
2.3.2 TIU DE CÉLULAS-TRONCO NÃO HEMATOPOIÉTICAS	29
2.3.3 TIU DE CTM	29
2.3.4 TIU DE CET HUMANAS	31
2.3.5 TRÁFEGO TRANSPLACENTÁRIO NO ÚTERO APÓS O TRANSPLANTE DE CTM	31
2.3.6 RESULTADOS CLÍNICOS: TIU EM TERAPIA CELULAR	32
2.3.7 TIU. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
2.4 POLPA DENTÁRIA É UMA FONTE PRIVILEGIADA DE CT	33
2.4.1 DESCOBERTA DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA DE DENTE DECÍDUO	33
2.4.2 CÉLULAS-TRONCO IMATURAS DE POLPA DENTÁRIA (CTIPD)	34
2.4.3 CTIPD E CAPACIDADE MIGRATÓRIA EM AMBIENTE EMBRIONÁRIO	35
3 JUSTIFICATIVA	37
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 AS CÉLULAS – CTIPDH (CÉLULA TRONCO IMATURA DE POLPA DE DENTE HUMANA)	41
5.2 - PROTOCOLOS NA PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE	43
5.2.1 - TRANSDUÇÃO DAS CTIPDH	43
5.2.2 MODELO ANIMAL	44
5.3 TÉCNICAS PARA TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO VIA INTRAUTERINA – TCTIU	44
5.3.1 ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL PARA A ESTIMATIVA DA IDADE FETAL	44
5.3.2 MAPEAMENTO DO ÚTERO E LOCALIZAÇÃO DAS CINTAS PLACENTÁRIA	45

5.3.3 PROCEDIMENTOS PARA O TRANSPLANTE INTRA UTERINO EM FETOS DE MODELO CANINO	45
5.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO	48
5.4.1 - ANÁLISE MORFOLÓGICA	48
5.4.2 MICROSCOPIA DE LUZ	48
5.4.3 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DIRETA	48
5.4.4 REAÇÕES DE IMUNOENSAIO	48
5.4.6 CITOMETRIA DE FLUXO	50

6 RESULTADOS **55**

6.1 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA O TRANSPLANTE DE CTIPDS HUMANAS VIA INTRAUTERINA NO ÚLTIMO TERÇO DA GESTAÇÃO EM MODELO CANINO	55
6.1.1. MODELO ANIMAL	55
6.1.2 GRUPO EXPERIMENTAL	55
6.1.3 ULTRASSONOGRAFIA ABDOMINAL PARA A ESTIMATIVA DA IDADE FETAL	56
6.2. TRANSDUÇÃO DE CTIPDS COM A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP – GREEN FLUORESCENCE PROTEIN, INGLÊS) UTILIZANDO A TÉCNICA DE TRANSDUÇÃO.	57
6.3 A ANÁLISE DE ENXERTIA DAS CTIPDS APÓS O TRANSPLANTE NOS TECIDOS DOS DIVERSOS ÓRGÃOS FETAIS CANINOS.	58
6.3.1 TECIDOS ORIUNDOS DO ENDODERMA	58
6.3.2 TECIDOS ORIUNDOS DO MESODERMA	61
6.3.3 TECIDOS ORIUNDOS DO ECTODERMA	63
6.3.4 TECIDO EXTRAEMBRIONÁRIO	63
6.4 QUANTIFICAÇÕES DA ENXERTIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DAS CTIPDS-GFP ⁺ APÓS TRANSPLANTE, REALIZADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.	64
6.4.1 QUANTIFICAÇÃO DA ENXERTIA DAS CTIPDS-GFP NOS TECIDOS PROVENIENTES DO	
6.4.2 QUANTIFICAÇÃO DA ENXERTIA DAS CTIPDS-GFP NOS TECIDOS PROVENIENTES DO	
6.4.3 QUANTIFICAÇÃO DA ENXERTIA DAS CTIPDS-GFP NOS TECIDOS PROVENIENTES DO	
6.4.4 QUANTIFICAÇÃO DA ENXERTIA DAS CTIPDS-GFP NOS TECIDOS PROVENIENTES DOS	
6.5 AVALIAÇÃO DO ESTADO FUNCIONAL DAS CTIPD: NÃO DIFERENCIADAS OU DIFERENCIADAS?	67
6.5.1 - EXPRESSÃO DE OCT 3/4 E OS MARCADORES DE CTM NO TECIDO MUSCULAR	67
6.5.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE CÉLULAS DIFERENCIADAS NO TECIDO MUSCULAR	68

6.5.3 - EXPRESSÃO DE OCT 3/4 E MARCADORES DAS CTM NO TECIDO PLACENTÁRIO	68
---	----

6.5.4 EXPRESSÃO DOS MACADORES DAS CÉLULAS DIFERENCIADAS NO TECIDO PLACENTÁRIO.	69
--	----

7 DISCUSSÃO	71
--------------------	-----------

7.1 TERAPIA CELULAR	71
---------------------	----

7.2 MODELO CANINO	71
-------------------	----

7.3 A TÉCNICA DE TUI E APLICAÇÃO DAS CT EM MODELO CANINO	72
--	----

7.4 PERÍODO GESTACIONAL E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS-TRONCO	73
--	----

7.5 CTIPDS E SUAS VANTAGENS PARA TUI	73
--------------------------------------	----

7.6 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS RESULTADOS OBTIDOS COM CTIPDS-GFP ⁺ E OUTROS TIPOS DE CTM	75
--	----

7.7 TRÁFEGO TRANSPLACENTÁRIO DAS CTIPDS	77
---	----

7.8 CAPACIDADE PROLIFERATIVA E AS TAXAS DA ENXERTIA DAS CTIPDS EM TECIDOS FETAL DE CÃO	77
--	----

7.9 EXPRESSÃO DE OCT3/4 E MARCADORES DE CTM EM CTIPDS APÓS A ENXERTIA	78
---	----

7.10 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DA DIFERENCIAÇÃO EM CTIPDS APÓS A ENXERTIA	79
--	----

8 CONCLUSÕES	82
---------------------	-----------

REFERÊNCIAS	85
--------------------	-----------

APÊNDICES	94
------------------	-----------

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

– *Rudolph Virchow, 1855* – “*toda célula origina-se de outra célula*” .

As células possuem propriedades tais como: crescimento, multiplicação, processamento de informações, resposta a estímulos e carregam incríveis reações químicas que as permitem formar um organismo inteiro. Tais habilidades definem a vida. Tanto os organismos unicelulares, quanto os multicelulares, apresentam estas propriedades, indicando que a célula é a unidade fundamental da vida. Apesar da grande diversidade de células que podem ser encontradas em tecidos adultos, todas se derivam de uma única célula – um óvulo, após a fecundação por um espermatozóide. Essa única célula como um engenheiro da natureza tem a propriedade de moldurar o organismo e formar todos os tecidos.

A natureza foi muito sábia para nos dar a capacidade de crescer e proteger o organismo contra doenças, injúrias e traumas. Deu-nos um presente generoso: as células-tronco fetais e pós-natais, residentes em seu nicho específico em todos os tecidos onde são mantidas quiescentes até o momento em que o organismo sofra algum dano e o ambiente celular receba uma sinalização ativando tais células. Conforme a necessidade os nichos são estimulados por este ambiente a produzir uma quantidade exata de células para o reparo de uma lesão ou doença. As células-tronco se multiplicam através do mecanismo de divisão (mitose) desigual, que visa à produção de uma célula-tronco para o nicho ser mantido e outra, um precursor imaturo, que vai se dividir, migrar e diferenciar.

A promessa da medicina regenerativa baseada em células tronco (CT) e, particularmente nas células tronco mesenquimais (CTM) adultas, depende criticamente da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam e mediam a diferenciação de uma determinada linhagem específica, o estabelecimento destas células em determinado tecido de interesse, e as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação celular.

REVISÃO

2 REVISÃO

2.1 CONCEITOS E DEFINIÇÕES

No início de tudo, existe uma única célula-tronco que será responsável por originar um organismo inteiro, graças a sua capacidade de diferenciação em diversas células especializadas, formando tecidos e órgãos complexos, e tudo começa com uma célula-tronco *Totipotente*, sendo capaz de dar origem aos mais de 250 tipos de células diferentes de um organismo. A célula gerada após a fertilização de um óvulo por um espermatozóide, a célula-ovo, inicia sua *divisão* e *expansão*, mantendo sua capacidade de totipotência – até a blastulação. Durante o desenvolvimento embrionário, ocorre uma perda da potencialidade das células iniciando diferentes graus de especialização, a este processo chamamos de *determinação* (Figura 1). Durante a gastrulação, as células tornam-se determinadas para formar as camadas germinais primárias: a ectoderme, endoderme e mesoderme, diferenciando-se respectivamente em: ectoderme em pele e cérebro; endoderme em órgãos do trato gastrointestinal (GI), fígado e pulmão; e o mesoderme em tecido conjuntivo – músculos, ossos, vasos sanguíneos e tecidos hematopoiéticos (SELL, 2004).

Figura 1- Células-tronco embrionárias e sua progênie. (SELL, 2004)

2.2 PLURIPOTÊNCIA E/OU PLASTICIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO

Quando a massa interna celular da mórula ou do blastocisto é isolada e cultivada *in vitro* passa ser chamada de células-tronco embrionárias (CET) *Pluripotentes* (EVANS; KAUFMANN, 1981; MARTIN, 1981; THOMPSON et al., 1998), ou seja, quando reintroduzidas em um blastocisto, as CET possuem capacidade de retomar o desenvolvimento normal, colonizando diferentes tecidos do embrião, incluindo a linhagem germinativa. Somente aquelas linhagens de CET capazes de colonizar a linhagem germinativa de um embrião são consideradas altamente pluripotentes.

Quando cultivadas em condições específicas, as CET podem ser mantidas em seu estado indiferenciado por múltiplas divisões celulares. Por outro lado, essas células podem ser induzidas a iniciar um programa de diferenciação *in vitro*. Por exemplo, quando cultivadas em suspensão, as CET formam espontaneamente agregados de células chamadas corpos embrióides (EBs - do inglês, *embryoid bodies*), que simulam o desenvolvimento de um embrião pré-implantado. Através de análises morfológicas, imunohistoquímicas e moleculares, encontra-se uma grande variedade de linhagens embrionárias dentro dos EBs tais como: hematopoética, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular (EVANS; KAUFMANN, 1981; MARTIN, 1981).

Historicamente, as células-tronco fibroblásticas, isoladas de um organismo adulto da medula óssea foram denominadas as células-tronco mesenquimais (CTM) ou/e estromais devido sua capacidade de se diferenciar nos derivados do mesoderma (FREUNDLICHSTEIN et al., 1976, 1996; CAPLAN, 1991, 2004). Atualmente, este conceito sofreu uma adaptação, devido à descoberta da capacidade mais ampla de diferenciação destas células, classificando as como células-tronco mesenquimais, *Multipotentes* (DOMINICCI et al., 2006; AFANASYEV; ELSTNER; ZANDER, 2009). Mais recentemente foram descobertas células-tronco adultas isoladas de tecidos natais ou pós-natais que apresentam um espectro mais amplo de diferenciação do que as CTM e ainda expressam marcadores de CTE (JIANG et al., 2002; KERKIS et al., 2006; MAFI, 2011.). Por fim, existe outro tipo de células-tronco que apresenta capacidade mais reduzida de diferenciação são as chamadas de células progenitoras (WEISSMANN, 2000; LODISH et al., 2003).

Desta forma, podemos concluir que estas definições são convencionais e que existem dois tipos principais de CT, as Embrionárias (CTE), das quais apresentam uma sub-divisão como CT-Germinativas, CT-Neuronais e outras CT-Pluripotentes, que possuem a capacidade

de produzir um organismo inteiro (Figura 2); e as Adultas (CTA) natais e pós-natais, que apresentam graus diferentes dessa capacidade: 1- mais amplas denominadas multipotentes, por exemplo, as CT de tecido adiposo, CT de medula óssea e CT imaturas de polpa dentária, 2- células precursoras que tem a capacidade de diferenciação mais restrita como os linfócitos T e B e outras células-tronco hematopoiéticas (CTH). Toda essa variedade (plasticidade) das CT garante o processo de auto-renovação do organismo durante a vida e a sua sobrevivência em caso de doenças, lesões, traumas ou injúrias adquiridas (CAPLAN, 1991, 1996, 2004, 2009, 2011).

As células-tronco adultas (CTA) são células tecido-específicas que constituem uma população de células multipotentes que, ao contrário do que se acreditava inicialmente, não estão envolvidas apenas no processo de reparação dos tecidos específicos adultos dos quais são isoladas, mas também possuem grande capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares do organismo (CAPLAN, 1991, 2004). Nos últimos anos, foi demonstrado que CTA podem ser obtidas a partir de vários tecidos adultos, tais como: medula óssea, polpa dentária e tecido adiposo (Figura 3).

Todas as populações de células-tronco pluripotentes, multipotentes e progenitoras são heterogêneas (Figura 4A) devido a um padrão de divisão desigual, na qual sua auto-renovação e a atividade proliferativa são diminuídas gradualmente e as células vão progredindo em direção à diferenciação (Figura 4B).

Knoblich (2001) descreve a divisão celular como células que podem se dividir de duas formas distintas. Na divisão simétrica, uma célula dá origem a duas células-filhas que são idênticas entre si e exatamente iguais à célula-mãe. Neste caso não ocorre diferenciação. Porém, na divisão assimétrica, a distribuição dos componentes celulares no momento da citocinese ocorre de forma desigual. Sendo assim, as células formadas são diferentes entre si, podendo uma delas ser igual ou diferente da célula-mãe e, desta forma, participar da formação de diferentes tecidos.

As CTA apresentam características atrativas para seu uso na terapia celular e engenharia tecidual por apresentarem capacidade em originar praticamente todos os tipos celulares do organismo por não apresentarem questionamentos éticos quanto a sua utilização, por não formarem teratomas e possuírem a função de regeneração dos tecidos durante a vida de um organismo. (CAPLAN, 2003, 2005).

Figura 2- A massa interna celular (botão embrionário) é isolada e cultivada *in vitro*. Seguindo a digestão enzimática, a suspensão unicelular obtida é semeada. A partir de uma única célula surgem as colônias novas com as características semelhantes à colônia “mãe”. Desta forma, elas são mantidas durante um longo período *in vitro*, o que permite sua expansão praticamente ilimitada. Cada uma dessas células é virtualmente capaz de criar um organismo inteiro, portanto elas são consideradas totipotentes = pluripotentes (de acordo com o conceito atual). (Lab. Kerkis I, não publicado)

Figura 3- Células-tronco adultas multipotentes são encontradas em todos os tecidos do organismo com íntima ligação com vasos sanguíneos. A heterogeneidade da população de CT isoladas e cultivadas *in vitro* deve-se à presença de células-tronco imaturas multipotentes e a sua “contaminação” com as células estromais (células mesenquimais = pericitos) e células progenitoras em diferentes estágios de maturação. Essas células possuem capacidade de produzir tipos celulares diferentes e regenerar o tecido. Além disto, essas células possuem efeito trófico, graças à liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Essa é a descoberta mais recente, que irá ser discutida adiante. (Lab. Kerkis I, não publicado)

Figura 4- A- Populações heterogêneas de células-tronco embrionárias e adultas. B - Padrão de divisão e de diferenciação das células-tronco. (Lab. Kerkis I, não publicado)

2.3 TRANSPLANTE INTRA-UTERINO (TIU) DE CÉLULA-TRONCO

CONSIDERAÇÕES GERAIS.

Desde os experimentos inspiradores de Bullingham, Brent e Medawar¹ (1953 apud NIJAGAL et al., 2011), utilizando o rato como modelo animal, o TIU vem despertando interesse na medicina fetal. Os pesquisadores demonstraram pioneiramente que o ambiente fetal oferece várias vantagens no tratamento de doenças do feto. Importantes revisões publicadas tais como Muench e Barcena (2004); Sell (2004); Muench (2006); Schoeberlein (2006); Lulu e Storb (2007) e Westgreen (2006) referem 3 principais vantagens em tratar o conceito durante a gestação: 1. Rápido crescimento do feto, proporcionando melhor oportunidade das células transplantadas para a enxertia e expansão; 2. Pelo sistema imune imaturo do feto, portanto não havendo riscos de rejeição das células doadoras; 3. Possibilidade de interferir precocemente no processo do desenvolvimento de certas doenças.

Dentre as desvantagens (limites) apontadas são aquelas decorrentes do TIU de de CTH as quais incluem a toxicidade, necessidade de imunossupressão, às doenças relacionadas ao enxerto versus hospedeiro (GVHD – graft versus host disease), a rejeição pelo fato de apenas < 25% dos fetos terem a possibilidade de ter um doador haploidêntico, e o fato de determinadas doenças congênitas terem lesionado órgãos e tecidos antes ainda do transplante ter sido aplicado (FLAKE; ZANJANI, 1999; JONES, 1999; BLAKEMORE et al.; 2004; MUENCH; BARCENA, 2004; NIJAGAL et al.; 2011).

O transplante intra-uterino (TIU) de células-tronco é uma abordagem terapêutica que vem sendo utilizada cada vez mais para o tratamento de várias doenças que se manifestam já na vida natal. Nos primeiros estágios da gestação o feto apresenta-se imunologicamente imaturo, portanto pouco susceptível aos antígenos de um doador. Assim, o TIU tem apresentando um maior avanço no tratamento de doenças congênitas, hematológicas, metabólicas e imunológicas (FLAKE, 2004; WESTGREN et al.; 2006; LI et al., 2011; NIJAGAL et al., 2011; VAAGS et al., 2011).

¹BILLINGHAM RE, BRENT L, MEDAWAR PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 3;172(4379):603–606.

Para aplicação desta técnica na prática clínica estudos pré-clínicos realizados em animais são necessários. Os seguintes pontos críticos devem ser considerados: (1) a idade gestacional do feto (MUENCH, 2005); (2) a dose de células a ser inoculada; (3) biologia da célula – proliferação, migração e plasticidade; (4) via de aplicação utilizada para o transplante; (5) adequação do tipo de célula para a doença específica. Sendo assim, o estudo da biodistribuição (em órgãos e tecidos) das células-tronco no ambiente intra-uterino é de vital importância, já que sabemos que estas células possuem a capacidade de multiplicação, diferenciação e adaptação ao microambiente onde se instalaram (LIECHTY et al.; 2000; BLAKEMORE et al.; 2004; LE BLANC et al.; 2005; O'DONOGHUE, 2006; GUILLOT et al., 2008; CHEN et al.; 2008).

2.3.1 TIU de CTH ou em combinação com CTM isoladas de tecidos adultos e fetais

As CTH adultas e fetais foram as primeiras a serem utilizadas na TIU com sucesso. CTH isoladas do fígado fetal e da medula óssea de camundongo adulto foram microinjectadas através de vaso sanguíneo placentário em fetos de camundongos que apresentam uma anemia macrocítica pela redução da proliferação de células-tronco. Este experimento demonstrou o enxerto das CTH em diversos tecidos dos animais deficientes. Foi também descoberto que os animais mutantes, que apresentam um grau mais grave da doença, apresentaram uma enxertia das CTH mais rapidamente e com maior eficiência. Importante mencionar que neste estudo o transplante alogênico das CTH de fígado fetal foi aceito sem qualquer tipo da reação imunológica, demonstrando haver à ausência de uma barreira no desenvolvimento que poderia impedir a enxertia (FLEISCHMAN, MINTZ, 1984; MINTZ et al., 1984; ZANJANI, 1997).

O primeiro estudo com TIU em humanos para tratar imunodeficiências utilizou tecidos fetais do fígado e timo como uma fonte doadora de células-tronco. Os fetos com imunodeficiência severa combinada (*do inglês SCID*) e *Síndrome da barreira linfocitária* receberam um transplante destas células na sétima e oitava semanas de gestação por injeção intravenosa o que resultou na reconstituição de células T nos fetos receptores (TOURAINÉ, 1996).

Há relatos na literatura fazendo uma comparação quantitativa entre os TIU de CTH fetais e adultas, porém em alguns estudos com modelos animais, apresentando melhora

significativa do enxerto foi observada quando populações mistas de células do fígado fetal e adulto mesenquimais foram utilizadas (FLAKE, 2004; WESTGREN et al., 2006; LUPU; STORB, 2007). Recentemente, um trabalho realizou a TIU de CTM e mononucleares de medula óssea através do saco vitelino em modelo canino. Esta via de injeção é bastante interessante, pois é uma abordagem minimamente invasiva. Doses variadas de células alógenas marcadas com nanopartículas fluorescentes supraparamagnéticas de óxido de ferro foram injetadas em fetos caninos entre o 25º e 35º dia de desenvolvimento fetal e estas migraram predominantemente para os tecidos de origem hematopoiética (VAAGS et al., 2011).

Em outro estudo em modelo caprino quando se utilizou TIU de CTH do fígado fetal comparado com CTH do fígado adulto, aparentemente evidenciou-se o maior quimerismo sendo que a taxa de enxerto para ambos os tipos de células foi muito baixa, menor que 1% (OPPENHEIM et al., 2001). Em camundongo, a utilização de CTH do fígado fetal demonstrou que as mesmas foram capazes de corrigir um defeito hematopoiético em fetos mutantes deficientes em CTH quase 10 vezes melhor do que um número igual de CTH de medula óssea adulta (BARKER et al., 2001; TAYLOR et al., 2002). Além disso, as populações de CT isoladas da medula óssea e do fígado fetal, que contêm as CTM, bem como CTH, demonstraram enxerto no músculo esquelético em camundongos com distrofia muscular (MACKENZIE et al., 2002). Embora esses resultados possam depender em parte das diferentes propriedades das CT fetais e adultas, sugere-se que nos enxertos fetais, em alguns desses modelos, são produzidos fatores que favorecem a enxertia das CT fetais em um recipiente fetal em detrimento da enxertia das CT adultas (MACKENZIE; FLAKE, 2002; MUENCH; BARCENA, 2004). Ainda, CTH de cordão umbilical foram também utilizadas em TIU sugerindo uma nova via de aplicação através de cavidade intracelômica (NOIA et al., 2003). Muench (2005) refere que no início da vida fetal, o conceito mostra-se excepcionalmente tolerante a antígenos, já que demonstram compatibilidade a células alogênicas ou xenogênicas, não havendo a necessidade de induzir imunossupressão.

O desafio maior no TIU de CTM, assim como CTH, é a obtenção de níveis de quimerismo suficientemente altos para que um impacto clínico significativo possa ocorrer. Também, precisa ser esclarecido se o enxerto das CTH ocorre devido à fusão com as células do organismo receptor ou pela proliferação das células transplantadas (TERADA et al., 2002; YING et al., 2002).

2.3.2 TIU de células-tronco não hematopoiéticas

Terapia celular fetal não é limitada pelo uso exclusivo das CTH (WESTGREN, 2006). As CT e células progenitoras, que existem em todos os tecidos de organismo, podem ser isoladas e transplantadas com sucesso, podendo trazer benefícios diversos para terapia celular intrauterina (SANTORE; ROYBAL; FLAKE, 2009).

O TIU eficiente de hepatócitos poderá oferecer oportunidade para o tratamento de uma série de doenças metabólicas hereditárias. Os transplantes bem sucedidos de hepatócitos, que são células relativamente grandes e frágeis, foram realizados em modelo murino e em humanos. Com objetivo aumentar a eficiência do enxerto, hepatócitos humanos foram transplantados em combinação com células natais e pós-natais (WU et al., 2001; SHIKANAI et al., 2009). Os fetos de camundongos deficientes do fator X receberam TIU de hepatócitos derivados de camundongos normais. Como resultado, o nível plasmático deste fator subiu de 1% para 6%, que é o nível normal para camundongos (TAYLOR et al., 2002).

Ainda em TIU, células epiteliais do âmnio foram transduzidas com vetor adenoviral e transplantadas em fígado de feto de rato (TAKAHASHI et al., 2002). Desta forma, abre-se a possibilidade de combinação do TIU de células-tronco com a terapia gênica (ROYBAL; SANTORE; FLAKE, 2010).

2.3.3 TIU de CTM

No trabalho pioneiro de Liechty et al., (2000) foi realizado o TIU de CTM de medula óssea humana, em ovelha no início da gestação. Neste sistema xenogênico as CTM demonstraram a enxertia em vários tecidos persistindo ainda treze meses após o transplante. As CTM humanas transplantadas sofreram diferenciação específica em condrócitos, adipócitos, miócitos e cardiomiócitos, células do estroma da medula óssea e do estroma tímico no sítio do enxerto. Deste estudo foi demonstrado que as CTM mantiveram a sua capacidade multipotencial e ainda suas características imunológicas únicas após o transplante, permitindo a persistência em ambientes xenogênicos sem a rejeição imunológica (LIECHTY et al., 2000). Posteriormente, estes resultados foram confirmados por Mackenzie et al. (2002) e Porada et al. (2006)

Outro grupo usou o transplante alogênico de CTM em útero de ovelha no 14º dia de gestação, porém o mesmo também resultou em baixo nível de quimerismo, mas demonstrou o enxerto em múltiplos órgãos (SCHOEBERLEIN et al., 2005).

Quando CTM de medula óssea humanas foram injetadas em útero de camundongo no 14º dia de gestação estas demonstraram o enxerto nos tecidos derivados dos três folhetos embrionários, o que foi mantido após quatro meses do nascimento. Importante mencionar, que células CD45+ (marcador de linfócitos humanos) foram detectadas no sangue periférico do camundongo (CHOU et al., 2006). Este trabalho sugere que a população CTM pode conter células precursoras que são capazes, em ambiente apropriado, de se diferenciar em células sanguíneas.

Para investigar a utilidade de CTM da medula óssea em modelo de desenvolvimento cardíaco em mamíferos, estas células de origem adulta e fetal foram injetadas, via intraperitoneal, em fetos de ovelhas. Não houve diferenças entre os enxertos de CTM isoladas de medula óssea adulta ou do cérebro e fígado fetal. A maioria das células de origem humana enxertou-se nas fibras de Purkinje. Aproximadamente 43,2% de fibras de Purkinje eram de origem humana, em contraste, somente 0,01% dos cardiomiócitos eram de origem das CTM (AIREY et al., 2004).

As CTM humanas, obtidas do sangue fetal periférico no primeiro trimestre de gestação, foram aplicadas no útero de camundongos homozigotos com osteogênese imperfeita (OI), que resulta em múltiplas fraturas e é atualmente tratada somente sintomaticamente. Células do doador foram encontradas nos ossos do animal e expressaram os genes da linhagem osteoblástica, produzindo proteína extracelular estrutural óssea - osteopontina. Além disso, após o tratamento houve uma redução acentuada das fraturas e anormalidades esqueléticas (GUILLOT et al., 2007).

As CTM humanas derivadas de âmnio e placenta também foram utilizadas no TIU em modelo animal, embora apresentando migração e localização em diferentes órgãos dos organismos estudados, o nível do enxerto permaneceu baixo (CHEN et al., 2008). Em um estudo semelhante, CTM derivadas de placenta apresentaram a migração preferencial para a mesma (CHEN et al., 2009).

O transplante autólogo de CTM derivadas de líquido amniótico foi realizado em ovelha e as células-tronco GFP positivas foram detectadas nos tecidos fetais, incluindo

coração, fígado, placenta, membrana, cordão umbilical, glândula adrenal e músculo (SHAW et al., 2010).

O transplante alogênico de CTM derivadas do fígado fetal de coelho foi realizado através de duas vias de administração: intra-hepática e intra-amniótica. O enxerto foi estudado após 10 e 16 dias e a baixa enxertia destas células foi observada que, porém persistiu durante 16 semanas (MORENO et al., 2011).

2.3.4 TIU de CET humanas

Para verificar a capacidades das CTE humanas de se diferenciar em neurônios funcionais *in vivo*, o TIU destas células no 14º dia de gestação em camundongo no ventrículo lateral do cérebro foi realizado. Este estudo demonstrou que CTE foram capazes integrar no cérebro de camundongo e produzir astrócitos localizados predominantemente no parênquima e neurônios funcionais, que foram encontrados migrando na área subventricular ao longo do fluxo migratório facial e também no bulbo olfatório, embora o enxerto destas no cérebro foi baixo $> 0,1\%$ (MUOTRI et al., 2005).

2.3.5 Tráfego transplacentário no útero após o transplante de CTM

Tráfego transplacentário de células fetais progenitoras e células diferenciadas durante a gravidez é um fenômeno bem conhecido. Foi sugerido que o microquimerismo das CTM derivadas do fígado em diferentes tecidos do feto depende da idade gestacional (O'DONOGHUE et al., 2008). Em um estudo CTM/EGFP + foram injetadas através da via intraperitoneal em fetos em embriões de camundongo no 12º e no 13º dias de gestação. O enxerto em órgãos maternos foi avaliado um dia após o TIU e as CTM foram encontradas principalmente na placenta. Poucas células foram encontradas no sitio da laparotomia. Três dias após o TIU, o enxerto de CTM diminuiu significativamente na placenta, ao passo que foi aumentado dentro da ferida cirúrgica. Uma semana depois do TIU as CTM foram detectadas em tais órgãos maternos, como a medula óssea ou o baço. A ferida cirúrgica apresentou quimerismo celular em todos os fetos. Quatro semanas após o parto, estas células estavam ainda presentes nas feridas cirúrgicas (TROEGER et al., 2010).

2.3.6 Resultados clínicos: TIU em terapia celular

Embora não seja o foco do presente estudo consideramos importante mencionar que a técnica do TIU já está sendo usada em terapia celular para tratar doenças humanas (TROEGER et al., 2006). A OI foi diagnosticada e CTM (XY) foram utilizadas para tratar um feto feminino (XX) com fraturas múltiplas 32ª semana de gravidez. A presença de CTM foi confirmada utilizando uma sonda específica contra o cromossomo Y. Após dois anos, o desenvolvimento psicomotor foi normal e crescimento foi seguido sem alterações (LE BLANC et al., 2005). Entre as doenças que podem ser tratadas utilizando o TIU de CT podemos também destacar: (1) Imunodeficiências - Síndrome da imunodeficiência combinada grave (SCID) (genética), Síndrome de Chediak-Higashi, Síndrome de Kostman's, Doença crônica granulomatosa, Síndrome de DiGeorge; (2) Hemoglobinopatias e Doenças de Rh, α -thalassemia, β -thalassemia, Anemia Falciforme, Anemia de Fanconi (genética), Anemia de Blackfan-Diamond; (3) Doenças de armazenamento enzimático, Doença de Gaucher, Síndrome de Maroteaux-Lamy, Leucodistrofia celular globóide, Doença de Hurler, Doença de Hunter, Adrenoleucodistrofia, Doença de Niemann-Pick, (4) Outras mais incomuns como a Síndrome de Wiskott-Aldrich (JONES et al., 1999; WESTGREN et al., 1996, 2002; MUENCH et al., 2001; BARTOLOME et al., 2002; FLAKE, 2004, LUPU; STORB, 2007; TROEGER et al., 2010).

2.3.7 TIU. Considerações finais

Baseado na análise da literatura pode-se concluir que o TIU de CT é uma técnica que terá uma futura aplicação clínica, por ser bem tolerada pelo organismo fetal e materno. Diferentes tipos celulares: CTH e CT não hematopoiéticas, por exemplo, células hepáticas, CTM adultas e fetais, CTE e a mistura entre diferentes tipos celulares estão sendo utilizadas. Foi possível realizar transplantes autólogos, alógenos e xenólogos em vários modelos animais, assim como, em alguns estudos clínicos.

Foi observada a migração destas células e sua longa persistência em vários órgãos e tecidos. A enxertia e a diferenciação específica no sítio do enxerto foram detectadas. Porém, em poucos estudos as CT apresentaram um enxerto denso. Foi demonstrado que a taxa de enxerto depende da idade do feto e, aparentemente, parece ser mais acentuada quando as CT foram transplantadas em períodos mais tardios de gestação. Nos últimos anos, novas fontes

das CT de fácil acesso, como gordura e polpa dentária, foram descritas, porém as CT multipotentes isoladas destas fontes nunca foram aplicadas em TIU e sua biodistribuição, capacidade de proliferação, migração e diferenciação também ainda não foi elucidadas.

2.4 POLPA DENTÁRIA É UMA FONTE PRIVILEGIADA DE CT

Para melhor compreensão das propriedades únicas das células-tronco imaturas de polpa dentária (CTIPD) temos que lembrar a origem embrionária do tecido pulpar. Os tecidos crânios-faciais são originados da crista neural, que é uma estrutura transitória embrionária. De acordo com os conhecimentos atuais CT da crista neural (CTCN) embrionária têm alta capacidade de se auto-renovar e apresentam um potencial de diferenciação semelhante as CET (KERKIS; CAPLAN, 2012).

CTCN pós-migratórias originam a maioria das células e geram os tecidos do sistema nervoso periférico, bem como vários tipos de células não-neurais, tais como as células do músculo liso do sistema cardiovascular, as células pigmentosas - epiteliais da pele, ossos craniofaciais, cartilagem e tecido conjuntivo, epitélio corneano e polpa dentária, assim como algumas outras (LE DOUARIN; DUPIN, 2003; LE DOUARIN et al., 2004, 2008).

2.4.1 Descoberta das células-tronco de polpa dentária de dente decíduo

Miura et al. (2003) isolaram células-tronco de dente decíduos de leite (*human exfoliated deciduous teeth* - SHED), de pacientes jovens seguindo o protocolo de digestão enzimática que resultou em isolamento de uma população mista das células entre as quais algumas apresentaram características de CTM. Para a caracterização destas células, os autores utilizaram tais anticorpos: anti-STRO-1, que potencialmente define uma subpopulação de células progenitoras, e anti-CD146 (MUC18), que é um marcador de progenitores das CTM. No entanto, após o isolamento e expansão *ex vivo* apenas 9% dessas células apresentaram reação positiva ao anticorpo anti-STRO-1 (Figura 5).

A descoberta de CT em dentes decíduos ou imaturos (“dentes de leite”) é extremamente relevante, pois abre uma nova janela no desenvolvimento para o isolamento de CT com alto potencial de diferenciação. Os dentes decíduos são descartados após a esfoliação e representam uma vantajosa fonte de fácil acesso. Vários dentes podem ser utilizados para coletar a polpa dentária e para o isolamento de CTM em grande quantidade (KERKIS et al.,

2006). Portanto, as CTM de polpa dentária tornam-se uma fonte atrativa para ensaios clínicos e medicina regenerativa (KERKIS; CAPLAN, 2012).

Figura 5 – Método para isolamento e expansão *ex-vivo* de colônias de células SHED (acima) e CTIPD (abaixo)

2.4.2 Células-tronco imaturas de polpa dentária (CTIPD)

Em 2006, Dra. Irina Kerkis e colaboradores isolaram CT imaturas de polpa dentária (CTIPD), seguido à técnica de explante do tecido pulpar (procedimento utilizado para o isolamento CTCN) e sob condições de cultivo similares às usadas para as CTE (Figura 3). Os estudos imunocitoquímicos demonstraram que as CTIPD expressam marcadores de CTE humanas como: Oct-4 (fator de transcrição do Octâmero- 4), Nanog (fator de transcrição, e fator chave da pluripotência), SSEA-3 e 4 (antígenos embrionários estágio-específico), TRA-1-60, TRA-1-81 (antígenos de reconhecimento tumoral) e marcadores de CTM: CD105 (SH2), CD73 (SH3 e SH4), CD13 e CD31, os quais foram observados em aproximadamente 97% das células e não expressaram marcadores hematopoiéticos. As CTIPD apresentaram também rápida proliferação, alta capacidade clonogênica, ótima expansão *in vitro*, podendo ser

mantidas em cultura por longo período (KERKIS et al., 2006). Atualmente, pode-se concluir que CTIPD são os precursores multipotentes de população conhecida como a SHED (KERKIS et al., 2006, BELTRÃO-BRAGA et al., 2011, KERKIS, CAPLAN, 2012).

2.4.3 CTIPD e capacidade migratória em ambiente embrionário

Quando as CTIPDs foram injetadas em embriões de camundongos nas fases iniciais do desenvolvimento (mórula e blástula), foi demonstrado que contribuem no desenvolvimento embrionário, formando alguns tecidos quiméricos camundongo/humanos e apresentam alta capacidade de enxertia nos tecidos do organismo recipiente (FONSECA et al., 2009).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Para este estudo, utilizamos CTIPD devido suas características biológicas únicas. De acordo com literatura e nossos dados, as CTIPD compartilham todas as características das células tronco originadas crista neural (CTCN): expressam marcadores da CTM (SH2, SH3 e SH4), precursores ectodérmicos (Nestin) e de CTE (Oct3/4, NANOG), exibem capacidade clonogênica, formação de esferas e capacidade de se diferenciar em vários tipos de células *in vitro* e *in vivo*: neurônios, glia, condrócitos, melanócitos, epitélio, músculo esquelético e liso, células adiposas e osteoblastos. As CTIPD podem sofrer diferenciação espontânea semelhante às CTE. Com o potencial de desenvolvimento atual, as CTIPD podem contribuir para a formação da fibra muscular, de tecido ósseo e de tecido da córnea (KERKIS *et al.*, 2006, 2008; DE MENDONÇA COSTA *et al.* 2008; FONSECA *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2009; FEITOSA *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2010; KERKIS, CAPLAN, 2012). As CTIPD apresentam capacidade migratória típica de CTM e não formam teratomas, ao contrário das CTE que são células *epitelial-like* e que formam junções intracelulares tipo “*gap junction*” sendo incapazes de migrar, o que faz com que ocorra a formação de teratoma.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi caracterizar o TIU das CTIPD humanas durante o período fetal canino, incluindo: biodistribuição, capacidade migratória, bem como a enxertia nos tecidos. Tal objetivo estabeleceu-se a partir dos resultados obtidos anteriormente, demonstrando a capacidade migratória das CTIPD no período embrionário em camundongo (FONSECA et al., 2009).

Objetivos específicos:

1. Realizar o protocolo de transdução das CTIPD com a proteína verde fluorescente (GFP – *green fluorescence protein*) com a finalidade de rastreá-las nos tecidos dos fetos caninos.
2. Estabelecer um protocolo para o TIU de CTIPD humanas no último terço da gestação em cães sem raça definida.
3. Analisar histologicamente a enxertia nos tecidos a fim de detectar as possíveis consequências do enxerto das CTIPD-GFP⁺ sete dias após o TIU.
4. Analisar a migração, a proliferação e a biodistribuição das CTIPD-GFP⁺ em tecidos derivados dos três folhetos embrionários, após a injeção intraperitoneal destas células em fetos caninos, através da análise por Microscopia Confocal (Método de Fluorescência Direta).
5. Confirmar a enxertia, o comportamento migratório, a biodistribuição e a pluripotência das CTIPD-GFP⁺ utilizando métodos de IF (imunofluorescência), IHQ (imunohistoquímica) e análise por FISH (*hibridização fluorescente in situ*) com sondas de DNA que reconhecem e se hibridam com sua sequência complementar nos cromossomos humanos 13, 18 e 21.
6. Quantificar o enxerto das CTIPD-GFP⁺ nos tecidos analisados e verificar o estado funcional (indiferenciado ou diferenciado) das CTIPD-GFP⁺ por transdução com anticorpos apropriados por Citometria de Fluxo.
7. Analisar o enxerto, a migração, a biodistribuição e a pluripotência das CTIPD-GFP⁺ no tecido placentário – folheto extraembrionário utilizando os métodos acima citados.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AS CÉLULAS – CTIPDH (CÉLULA TRONCO IMATURA DE POLPA DE DENTE HUMANA)

ESTUDO *in vitro*

As células utilizadas para esta pesquisa são células extraídas da polpa dentária imatura humana DL1/1, sendo que DL1 refere-se à linhagem e 1 refere-se à passagem, com metodologia estabelecida por Kerkis et al., (2006), com patente depositado no INP. A linhagem DL1/1 foi extraída de dentes imaturos esfoliados de uma criança com sete anos de idade, após consentimento legítimo dos responsáveis. Para extração da polpa dentária, o dente foi serrilhado ainda fora do fluxo laminar, logo após, com auxílio de uma lima e uma pinça anatômica, a polpa foi retirada, lavada com PBS e colocada na placa de cultivo 6x35 mm (NuncTM) (Figura 6-A)

Para o cultivo e expansão, o tecido foi plaqueado em meio fresco constituído de meio DMEM/Ham's F-12, (1:1, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB, Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen) e 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen) e mantidos em estufa para cultivo de células a temperatura de 37°C em 5% CO₂ até que as CT começassem a migrar do explante para a superfície plástica da placa.

Na etapa seguinte, as células provenientes do explante pulpar foram lavadas duas vezes com PBS (solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio de pH 7,4) e dissociadas enzimaticamente pela ação da tripsina 0,25% com ácido etileno-diaminotetracético EDTA 1mM (Invitrogen) por 5 minutos em estufa a 37°C em 5% CO₂. A tripsina foi inativada utilizando o meio de cultura com soro, as células foram ressuspensas em tubo de fundo cônico de 15 mL (TPP[®]) e centrifugadas a 89,6 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas utilizando meio de cultura e contadas utilizando câmara de Neubauer.

O subcultivo (repique) foi realizado quando cerca de 70% da área cultivável do frasco estava coberto por células. Para isso, 5 mL do meio de cultura foram removidos e reservados em tubo de centrifugação. A monocamada celular era lavada duas vezes com PBS. Para a

remoção da monocamada celular aderida no fundo do frasco, foi utilizado 1 mL de solução de tripsina por 5 minutos a 37°C. A tripsina foi inativada por meio de cultura contendo soro fetal bovino, e as células em suspensão transferidas para tubos de ensaio de 15 mL e centrifugadas a 89,6 g por 5 min em TA (temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura fresco. Aliquotas de 500 µL dessa suspensão de células eram distribuídas em frascos de 25 cm² (T25) contendo 5 mL de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem das linhagens celulares (Figura 6-B) e o seu crescimento foi analisado sob forma de gráfico.

Figura 6- (A) Célula-tronco imatura de polpa de dentária sobre biomaterial (I. Kerkis, dado não publicado). (B) Imagem representativa de CTIPD mantidas em cultura celular com formação de células fibroblasto-like

Durante todos os experimentos as células foram acompanhadas utilizando microscópio óptico invertido (Nikon, Eclipse TE200). Toda a manipulação celular foi realizada dentro do fluxo laminar equipado com filtro HEPA; seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções utilizadas (FRESHNEY, 2000); os meios de cultura e as soluções foram previamente aquecidos a 37°C em banho-maria ou a temperatura ambiente (TA); e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular. Todas as células são mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, umidade de 95% e 5% de Nitrogênio.

5.2 - PROTOCOLOS NA PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA TRANSPLANTE

Para a realização do xeno-transplante experimental fez-se necessário a preparação das CTIPDh para que pudessemos localizá-las nos tecidos e órgãos.

5.2.1 - Transdução das CTIPDH

Com o objetivo de localizar as células transplantadas, procedeu-se a transdução das CTIPDh. Vetores retrovirais contendo o gene repórter EGFP (*enhanced green fluorescent protein* - Addgene, www.addgene.org) foram produzidos por uma transfecção tripla (uma com o plasmídeo EGFP e duas com plasmídeos para empacotamento das partículas virais) em células HEK293T, seguida de uma ultracentrifugação para concentração dos vetores. As CTIPD foram transduzidas com um título de aproximadamente 0.5×10^{10} unidades de transferência de genes/ml por 24 horas. Após dois dias as CTIPD transduzidas foram analisadas por microscopia de fluorescência para a visualização de células fluorescentes (EGFP positivas) (Figura 7-B). A seguir CTIPD transduzidas foram selecionadas com gentamicina (G418) durante sete dias para a obtenção de uma população de células EGFP positivas (Figura 7-C). Após esta etapa, as CTIPD são mantidas congeladas a -80°C.

Figura 7- Transdução das CTIPD com GFP. A- Cultura semi-confluyente da CTIPDs. (Contraste de fase). B- Colônia das CTIPDs expressando GFP (verde). Núcleos marcados com DAPI (azul). C- Imagem da CTIPD GFP+ após a seleção. As setas vermelhas demonstram algumas células que não expressam o GFP. A = Contraste de fase (*Phase contrast, PC*); B= Epifluorescência (*Fluorescence confocal microscopy, Fcm*); C= *Fcm* + Contraste de Interferência Digital (*Digital interference contrast, DIC*). Barras de escala: A=; B=; C=

5.2.2 Modelo Animal

Grupo Experimental

Utilizou-se o modelo canino (*Canis lupus familiares*), SRD (sem raça definida), fêmea, 3-4 anos de idade, gestante com aproximadamente 43 dias de gestação. Esta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, assim como atesta o documento em anexo.

5.3 TÉCNICAS PARA TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO VIA INTRAUTERINA – TCTIU

A seguir descreveremos as diversas etapas necessárias para a realização do TIU

5.3.1 Ultrassonografia abdominal para a estimativa da idade fetal

Os exames ultrassonográficos foram realizados nos dias 3, 2, e 1 que antecederam o procedimento cirúrgico, com um aparelho portátil da marca GE®, modelo Logic 100 MP, equipado com transdutores: linear de 7,5 MHz, convexo de 5,0 MHz e outro Endocavitário. As imagens foram documentadas digitalmente, diretamente em um pendrive.

O transdutor linear de 7,5 MHz foi utilizado em todos os exames para avaliação clínica dos órgãos e do útero, enquanto que o transdutor de 5 MHz foi útil para avaliar o corpo fetal em seu comprimento e dimensões, especialmente quando este ultrapassa os limites da placenta zonária, tais como: CR (comprimento do corpo - Crow-Rump) foi mensurado a partir da distância entre o ponto mais rostral do crânio até a base da cauda, DTC (diâmetro transversal do feto) obteve-se a partir da distância dorso-ventral e latero-lateral do feto. A medida de EP (espessura da placenta) foi obtida a fim de delimitar a estrutura em relação às membranas.

A fim de determinar a idade fetal, certificando-se que os fetos apresentavam idade igual ou superior a 43 dias, obtivemos através da avaliação das ecogenicidades do pulmão e do fígado. Foram auferidas, também, as frequências cardíacas (FC) certificando-se da viabilidade fetal antes e após o transplante de células.

5.3.2 Mapeamento do útero e localização das cintas placentária

A ultrassonografia possibilitou o reconhecimento dos fetos, bem como sua viabilidade. Porém, o mapeamento do útero foi possível apenas após a Laparotomia Exploratória. No Esquema 1, demonstra-se topograficamente a localização dos fetos a semelhança do que ocorreu no exato momento anterior ao transplante.

Esquema 1 - Exemplificando os cornos uterinos do modelo experimental:

Grupo tratamento fetos 1, 3, 4 e 5 do corno uterino direito (CUd) - receberam transplante de CTIPDh GFP⁺. **Grupo controle** fetos 2 e 7 do corno uterino esquerdo (CUE) - coletados para controle experimental.

5.3.3 Procedimentos para o transplante intra uterino em fetos de modelo canino

Dividimos os procedimentos cirúrgicos utilizados nesta pesquisa em 3 diferentes momentos:

1º MOMENTO início 3 dias que antecedem o procedimento cirúrgico I

- 1- Avaliação clínica da fêmea gestante
- 2- US abdominal para determinar idade e viabilidade fetal
- 3- Coleta de sangue para hemograma completo

4- Jejum alimentar de 12 horas antes do procedimento cirúrgico e 4 horas de jejum hídrico.

5- Técnica Anestésica em ambos procedimentos cirúrgicos:

- Pré-anestesia com Acepromazina (Univet, São Paulo, SP) na dose 0,1 mg/kg associada a Meperidina (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira, SP) 5 mg/kg IM (via intra muscular), 15 minutos após procedeu-se a Indução anestésica com Quetamina na dose de 7,5 mg/kg associado com Diazepan na dose 5 mg/kg, em seguida utilizou-se a Anestesia Epidural com Morfina na dose de 1,0 mg/3 kg associada com Lidocaína 2% sem vaso constritor (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos, Itapira, SP) via lombossacra com agulha hipodérmica 40x8. No trans-operatório utilizou-se Fentanil (analgésico) (Hipolabor, Sabará, MG) na dose 4,4 mg/kg IV (via inta-venosa) e Ampicilina Sódica (antibiótico) 20 mg/kg IV.

1- Procedimento cirúrgico I - Laparomia exploratória

2- Mapeamento uterino para contagem dos fetos e identificação das cintas placentárias dos fetos do corno uterino direito (CUd)

3- US-Guiado por transdutor endo-cavitário para identificação da cavidade peritoneal do feto

4- Transplante intrauterino de hCTIPD 1×10^6 células ressuspendidas em 1,0 ml solução fisiológica estéril via Intra-peritoneal dos fetos 1, 3, 4 e 5 do Cud.

5- Cuidados diários : ATB (antibiótico terapia) terapia com Enrofloxacin 10% na dose 5,0 mg/kg SC (via sub-cutânea) BID (a cada 12 horas) e Anti-flamatório Meloxicam 0,2 % na dose 0,2 mg/kg no 1º dia e 0,1 mg/kg nos 2º e 3º dias subsequentes via SC SID (a cada 24 horas) e Curativo local com líquido de Dakim e Iodo polvidine

6- Animal será mantido em canil com água e ração *ad libitum*, e colar Elizabetano como restrição mecânica animal.

2º MOMENTO realizado 7 dias após o transplante intra-uterino das CTIPDh GFP⁺

1- US abdominal para determinar viabilidade fetal (Frequência cardíaca – FC, peristaltismo fetal, movimentação fetal)

2- Coleta de sangue da mãe para hemograma completo

3- Jejum alimentar de 12 horas antes do procedimento cirúrgico e 4 horas de jejum hídrico.

Procedimento cirúrgico II – Para a OSH (Ovario-salpingo-histerectomia), nos 3 dias subsequentes procedeu-se:

1- US abdominal nos dias 1, 2 e 3 pós cirúrgico para avaliação clínica

2- Cuidados diários pós-operatórios semelhantes aos anteriores (ATB, Anti-flamatório e Curativo local)

3- Animal mantido em canil durante 3 dias com água e ração *ad libitum* e colar elizabetano.

4- Alta do animal com retorno para seu proprietário.

3º MOMENTO imediatamente após a retirada do útero procedeu-se:

NECRÓPSIA FETAL – coleta dos órgãos e tecidos dos fetos 1, 3, 4 e 5 (grupo tratamento – CUd) para posterior análise do Xeno-transplante, bem como dos fetos 2 e 7 do grupo controle – CUe + feto 2 do CUd (ver Esquema 2)

Esquema 2 – Protocolo de colheita e manutenção dos órgãos para posterior utilização

AMOSTRA 1 - 1/3 do órgão foi previamente incluído em paraformaldeído a 10%, e emblocado em parafina.

AMOSTRA 2 - 1/3 também será fixado em paraformaldeído a 10%, porém serão incluídas em OCT (“optimal cutting compound”-Tissue Tek®)

AMOSTRA 3 - 1/3 do órgão foi mantido congelado em criotubos em Freezer a -80° C.

5.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO

Para o estudo da biodistribuição de células tronco durante a vida intrauterina, utilizamos métodos que possibilitaram o rastreamento destas células nos órgãos e tecidos.

5.4.1 - Análise morfológica

Para a análise morfológica, utilizaremos as AMOSTRAS 1 e 2.

Imediatamente após a necropsia dos fetos, foram coletados os seguintes órgãos: Língua, Esôfago, Timo, Pulmão, Coração, Diafragma, Aorta abdominal, Estômago, Intestino Delgado (Jujuno), Baço, Rim Direito, Gônadas (Ovário ou Testículo), Cérebro, Cerebelo e Placenta, coletados de acordo com o Esquema 2.

5.4.2 Microscopia de luz

As amostras 1 foram emblocadas em parafina, cortadas a 4 – 5 µm (micrótomo-LEICA) e mantidas em lâminas silanizadas para melhor fixação. Após desparafinização, os cortes serão corados com hematoxilina-eosina (HE).

5.4.3 Microscopia de fluorescência direta

As amostras 2, incluídas em OCT (“optimal cutting compound” – Tissue Tek,) serão fixadas em sucrose e levadas ao freezer -20° C até o momento do processamento. Em seguida, cortados em criostato a temperatura -20° C (criossecção) com espessura de 5 micras e colocados em lâminas silanizadas ou albuminizadas. Para a análise destes cortes faz-se necessário à transdução de seus núcleos com PI (Iodeto de Propídio) e posterior visualização em Microscópio de Fluorescência e ou Confocal.

5.4.4 Reações de Imunoensaio

Para as reações de imunoensaio, as lâminas serão colocadas em câmara úmida, à temperatura ambiente.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para evitar reações inespecíficas foi utilizada solução de BSA por 30 minutos. Após este período os cortes foram incubados por 24 horas a 4°C com anticorpo primário, listados no Quadro 1. Passado este período, foram lavados com TBS por 3 vezes de 5 minutos cada.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-mouse conjugado FITC na concentração de 1:20 Anti-núcleo humano (HuNu), 1:250 para Anti-CTIPD e 1:500 Anti-GFP, por uma hora em câmara escura. Os cortes foram novamente lavados com TBS por 3 vezes de 5 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Após, foi realizada a montagem das lâminas com a solução de Vectashield e DAPI (ABCYS, Paris France).

Para a montagem das lâminas, utilizou-se glicerina tamponada (pH 9 / 0,5M) e lamínula de vidro. A leitura foi realizada em Microscópio marca Zeiss ocular de 20, 40, 60 e 100X.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para as técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica

Anticorpo primário	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
Anti-Núcleo-Humano (HuNu)	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
Anti-CTIPD	Policlonal	Camundongo	1:250	Instituto Butantan Lab/ genética
Anti-GFP	Policlonal	Humana	1:500	Millipore®

*Anti-CTIPD Humano – marcador citoplasmático e nuclear, específico de células de polpa de dente imaturo humano; **Anti-Núcleo-Humano - marcador nuclear de células humanas apresentando padrão nuclear difuso; ***Anti-GFP – identifica a proteína fluorescente verde no núcleo das células CTIPDh transduzidas.

IMUNOHISTOQUÍMICA

Para análise imunohistoquímica foram utilizados os cortes parafinados montados em lâminas. Para tal procedimento o material foi previamente incluído em paraformaldeído a 4%, emblocado em parafina e cortado a 4–5 µm (micrótomo-LEICA).

O rastreamento das CTIPDh GFP⁺ injetadas via IP, foi delineado a partir dos anticorpos (anti – CTIPD: marcador de polpa de dente humana e anti–Núcleo humano – HuNu e anti-GFP) como demonstrado no Quadro 1.

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização sendo imersas em xilol a 50°C durante 30 minutos e em seguida imersas em xilol em temperatura ambiente, por 20 minutos. Para minimizar a fluorescência natural dos tecidos, fez-se necessário imergir as lâminas em Metanol + Acetona “over night” antes do processo de desparafinização.

Após o processo de desparafinização, o material foi hidratado em séries decrescentes de álcoois (100%, 95% e 75%) por 2 minutos e encubado por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia para retirada do resíduo de formalina.

Durante o processo de fixação pode ocorrer o mascaramento de antígenos no tecido, dificultando assim a sua detecção. Para aumentar a exposição antigênica, foi utilizada a técnica de recuperação antigênica por calor úmido onde o material foi imerso em tampão citrato e colocado em banho Maria por 35 minutos.

Na etapa seguinte, a peroxidase endógena das lâminas foi bloqueada com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (1:1). Após esta etapa, os tecidos foram encubados com os anticorpos primários (Tabela 1) em câmara úmida por 24 horas a 4°C. Passado esta fase, o material foi revelado com o kit Envision da Dako e desidratado em uma série crescente de álcoois (50%, 75%, 95% e 100%).

O cromógeno utilizado foi o DAB (Dako®), as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Mayer, seladas com permount e visualizadas ao microscópio óptico.

5.4.6 Citometria de fluxo

Análises de marcadores por citometria de fluxo

Após o crescimento e expansão celular, as células em cultura foram tripsinizadas e inativadas com soro fetal bovino, colocadas em tubos de 15 mL em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70% e UV durante 20 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado à 1500 rpm durante 10 minutos para a formação do precipitado celular. Após

a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e ressuspendido em 5 mL solução salina 0,9% para lavagem, centrifugado à 1500 rpm durante 10 minutos e descartado novamente o sobrenadante e acrescentado o tampão FACS Flow, a suspensão foi transferida para tubos de citometria, e adicionados os anticorpos Anti-HuNu e Anti-CTIPD, CD 45, CK18, CD 146, OCT 3/4, β Integrina 1, Cardiotina, MyoD1 e Miogenina humanos, incubados por 15 minutos a 4°C. As análises de expressão foram realizadas em Citômetro de Fluxo FACS Calibur em 10.000 eventos, e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8. A expressão de marcadores foi determinada pela comparação com um isótopo controle marcado com o fluorocromo FITC inespecífico.

Para a avaliação da expressão dos marcadores citoplasmáticos e nucleares Anti-CTIPDh, Anti- HuNu e Oct3/4 as células foram permeabilizadas previamente com 10 μ l de Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos antes da adição dos anticorpos primários específicos. Os anticorpos utilizados estão listados no Quadro 2, sendo:

Quadro 2- Anticorpos utilizados para análise de marcadores por citometria de fluxo

Anticorpo primário	Tipo	Origem	Diluição	Procedência
CD45	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
CK18	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
CD146	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
Oct 3/4	Monoclonal	Humana	1:20	Santa Cruz
B Integrina 1	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
Cardiotina	Monoclonal	Humana	1:250	Millipore®
Myo D1	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®
Miogenina	Monoclonal	Humana	1:20	Millipore®

- Anti-CTIPD humano – marcador citoplasmático específico de células de polpa de dente imaturo
- Anti-Núcleo humano – marcador nuclear de células humanas apresentando padrão nuclear difuso.
- CD 45 - marcador de diferentes tipos de células hematopoiéticas e células T ativadas
- CK 18 – citoqueratina, marcador das células epiteliais.
- CD 146 – marcador de pericitos.
- Myo D1 – gene de determinação miogênica.
- Miogenina – gene da família Myo D, tem ação reguladora da miogênese, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário.
- Oct3/4 (Santa Cruz) – determinante de células tronco embrionárias e germinativas envolvidas aos fatores de transcrição na regulação da supressão de genes que levam a diferenciação e manutenção da pluripotência.

Análise das Fases do Ciclo Celular

Após a obtenção das células dos diferentes órgãos, as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1ml de etanol 70% RNase, transferidas para microtubos e armazenadas a uma temperatura de -20° C. As amostras fixadas e armazenadas previamente foram centrifugadas à 2000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1ml de tampão FACS de citometria e centrifugadas novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução de PI, preparada a partir de 5ml de PBS ao qual foram adicionados 5µl de triton 100 (0,01% v/v), 50µl de RNase A (2mg/ml) e 20µl de iodeto de propídio (5mg/ml). Em seguida realizou-se a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACS Calibur em 10.000 eventos, e para análise foi utilizado o programa Win Mdi 2.8.

Após a aquisição das populações celulares, as células positivas para proteína EGFP contidas no gate ou quadrante, foram selecionadas e determinado às fases do ciclo celular usando o canal FL-2 para a quantificação do PI (iodeto de propídio) incorporado nas células GFP⁺.

Interpretação dos Resultados

O Iodeto de Propídio (PI) é um fluorocromo que se intercala estequiometricamente às duplas fitas de DNA. A fluorescência foi captada em FL-2, e ela é proporcional ao conteúdo

de DNA na célula. Células diplóides que não estejam replicando (fases G0/G1 do ciclo celular) possuem conteúdo de células $2n$, emitindo sinais de menor intensidade que as células situadas na fase S, durante a qual ocorre o aumento do conteúdo de DNA. Células em fase S, por sua vez, geram sinais de menor intensidade que aquelas situadas em G2/M até que completem a replicação do conteúdo de DNA para $4n$, que permanece assim durante a fase G2 até a mitose, na qual cada célula mãe dá origem a duas células filhas.

As células situadas no pico hipodiplóide (Sub-G1) possuem conteúdo de DNA menor que $2n$, e podem representar aumento na ocorrência de debris celulares e DNA fragmentado, característicos de eventos de morte celular.

Todos os sinais gerados são amplificados e convertidos pelo aparelho em pulsos, permitindo a construção dos gráficos de distribuição das células no ciclo celular. Considerando a existência de uma relação proporcional entre o aumento do conteúdo de DNA e a área do pulso gerado.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA O TRANSPLANTE DE CTIPDS HUMANAS VIA INTRAUTERINA NO ÚLTIMO TERÇO DA GESTAÇÃO EM MODELO CANINO

Em pesquisa básica este modelo permite o estudo da dinâmica de migração, enxertia e estado funcional de diferentes tipos de células-tronco (CT). Estas células podem ser transplantadas em diferentes momentos do período gestacional, que pode ser dividido em três momentos do desenvolvimento fetal, sendo estes, diferentes funcionalmente. A escolha deste momento para o transplante influenciará tanto no comportamento celular quanto no resultado.

6.1.1. Modelo animal

No primeiro momento, nosso modelo animal constou de 5 fetos caninos com idade aproximada de 43 dias pós ovulação. A Figura 8 (Apêndice A) representa um dos fetos caninos utilizados (A1) com suas principais estruturas anatômicas próprias da idade escolhida para este estudo, como: Em 8 (A)- Membranas fetais; em 8 (B) após a retirada da membrana Alantóide, permitindo o desdobramento da placenta zoonária, em (C) demonstramos ausência de lesão no local do transplante das células via Intra-peritoneal (Apêndice A - Figura 8 – A, B e C).

6.1.2 Grupo experimental

O grupo experimental constou de 5 (cinco) fetos, sendo que 4 receberam o transplante (Fetos 1, 3, 4 e 5) de CTIPDh GFP⁺ e outros 2 foram utilizados como controle (Fetos 2 e 7). Na Figura 9 (Apêndice A) está sendo demonstrado o útero canino gravídico do modelo experimental, exposto após Laparotomia exploratória, Os números, sobre os cornos uterinos direito (CUd) e esquerdo (CUe) indicando os fetos A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7. (Apêndice A - Figura 9).

6.1.3 Ultrassonografia abdominal para a estimativa da idade fetal

Estes resultados referem-se ao feto A1, o qual foi utilizado para demonstrar o procedimento ultrassonográfico.

A idade gestacional e viabilidade fetal para a realização do transplante intrauterino foram avaliados através do exame ultrassonográfico. Mensuramos o diâmetro de algumas estruturas fetais para termos a ideia aproximada da idade gestacional. Para tanto, utilizamos os parâmetros: diâmetro transversal do tórax (DTT) (Apêndice B - Figura 10-A) e o diâmetro do abdome (DA) (Apêndice B - Figura 10-B) ao nível do estômago. De acordo com England, Yeager e Concannon (2003) estes devem ser proporcionais entre os dias 42º e 58º dias pós-ovulação. Obtivemos as medidas de 2,02 cm para o tórax e 2,39 cm para o abdome, indicando que o feto já havia completado a idade gestacional necessária para o procedimento.

Na Figura 10-A (Apêndice B), o coração do feto esta sendo demonstrado por estrela amarela com ecogenicidade variando de hipoecóico à anecóico e com ecos dos septos lineares que representam as paredes da câmara e válvulas do coração. As quatro câmaras do coração são vistas a partir do 40º dia e os grandes vasos cardíacos podem ser visualizados alguns dias após.

A ecogenicidade do pulmão pode variar durante desenvolvimento fetal sendo relativamente isoecóica em relação ao fígado quando vistos inicialmente, o que não proporciona uma definição clara entre pulmão e fígado, representado por triângulo amarelo para fígado e círculo amarelo para o pulmão (Apêndice B - Figura 10 - A). A orientação é feita pelo posicionamento do coração, estômago e vesícula urinária. Os pulmões se tornam hiperecóicos em relação ao fígado quando o feto se desenvolve do 38º ao 42º dia. Os rins visualizados entre o 39º e o 47º dia, nesta fase apresentam-se hipoecóicos. Com o tempo, podem ser diferenciadas a córtex e a medular renal e a pelve se torna menos dilatada.

A medida do CR (comprimento do corpo - Crow-Rump) foi realizada a partir da distância entre o ponto mais rostral do crânio até a base da cauda, onde obtivemos a medida 5,63 para CR. Esta medida é particularmente importante quando relacionada ao CP (comprimento da placenta), onde obtivemos a medida 4,78. Quando o comprimento da placenta excede o do CCR, indicando que o feto tem idade igual ou superior a 40 dias pós-ovulação (Apêndice B - Figura 11-A). A medida de EP (espessura da placenta) foi obtida a fim de delimitar a estrutura em relação das membranas (Apêndice B - Figura 11-B).

Durante o transplante das CTIPDh-GFP⁺ via IP nos fetos caninos (Apêndice C - Figura 12–A, B, C e D) foi necessário avaliar possível sofrimento fetal, procedemos então à aferição da FR (frequência respiratória), bem como a FCF (frequência cardíaca fetal) (Apêndice C - Figura 12 – A e B) através da eletrocardiografia fetal. A eletrocardiografia consta do registro de campos elétricos gerados pelo coração a partir da superfície corpórea. Ondas específicas representam estágios de despolarização e repolarização do miocárdio. É um teste diagnóstico valioso em medicina veterinária e de obtenção relativamente fácil. É o exame de escolha inicial no diagnóstico de arritmias cardíacas podendo, ainda, fornecer informações a respeito de dilatação e hipertrofia das câmaras cardíacas. A presença da variabilidade da FCF permanece o índice mais seguro de avaliação do bem estar fetal (SOUSA et.al., 2006). Na Figura 12–C e D (Apêndice C) demonstramos o momento do acesso IP (intraperitoneal) no feto A1. Vale observar que há uma natural acomodação das vísceras durante o procedimento. Imediatamente antes do transplante, injetamos 0,2 ml de solução salina a fim de auxiliar esta acomodação.

Na Figura 13 (Apêndice C), momento imediato do transplante, observamos a presença de líquido livre (LL) na cavidade intraperitoneal. Através da avaliação ultrassonográfica dos fetos no pós-operatório, não detectamos mais a presença de líquidos.

As principais complicações das intervenções intrauterinas humanas são: o prolapso de cordão umbilical, compressão do cordão com aumento das frequências FC e FR (cardíaca e respiratória) com desacelerações fetais, ruptura da vasa prévia, hemorragias, infecções ascendentes e desconforto durante a realização do procedimento. Entretanto, poucos estudos têm focado esses riscos (SOUSA; AMORIM, 2008).

6.2. TRANSDUÇÃO DE CTIPDS COM A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP – green fluorescence protein, inglês) UTILIZANDO A TÉCNICA DE TRANSDUÇÃO.

Realizamos a transdução das CTIPDs com o vetor *GFP* conforme o protocolo de transdução descrito na metodologia. A cultura semi-confluente das CTIPDs, que apresentam a morfologia de fibroblast-like, foi utilizada (Figura 7A). Após dois dias foi possível observar algumas células fluorescentes formando as colônias que expressam *GFP* (Figura 7B). Em

seguida, a fim de isolar a população das células que uniformemente expressam o *GFP*, o antibiótico geneticina foi adicionado ao meio de cultura. Uma vez que o vetor, utilizado na transdução, contém o gene responsável pela resistência contra este antibiótico, somente as células que contêm este vetor irão sobreviver. Desta forma obtivemos uma população onde a maioria das células expressa o *GFP*. Graças o efeito cooperativo entre as células, alguns delas podem sobreviver à seleção sem a integração do vetor (Figura 7C).

6.3 A ANÁLISE DE ENXERTIA DAS CTIPDS APÓS O TRANSPLANTE NOS TECIDOS DOS DIVERSOS ÓRGÃOS FETAIS CANINOS.

As CTIPD-*GFP*⁺ foram transplantadas intraperitonealmente via injeção guiada por ultrassonografia nos fetos caninos (~ 43 dias pós-ovulação) de um animal saudável. De forma geral as células-tronco adultas apresentam, quando aplicadas nos modelos com lesão, doença ou trauma, a distribuição preferencial nos tecidos afetados devido propriedades quimiotáticas destas células. Utilizando animal saudável esperamos a distribuição aleatória destas células nos tecidos diversos dos fetos caninos. Adicionalmente, hipotetizamos que as mesmas podem influenciar o ambiente normal induzindo micro lesões aonde foram enxertadas. Portanto, realizamos análise histológica, utilizando cortes seriados, parafinizados e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), que simultaneamente foram usados para análise por fluorescência direta identificando as células *GFP* positivas e posteriormente por imunohistoquímica (anticorpo Anti-núcleo humano e anti-*GFP*) e *FISH* a fim de confirmar a presença CTIPDs nos cortes analisados. Para fins práticos do presente trabalho organizamos este capítulo seguindo o raciocínio da contribuição destas células nos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma e também no tecido extraembrionário - placenta. Sendo assim analisamos os tecidos dos seguintes órgãos fetais: i. endoderma: estômago intestino, pulmão, fígado; ii. mesoderma: baço, coração, ovário, musculo esquelético; ectoderma: encéfalo (cérebro e cerebelo).

6.3.1 Tecidos oriundos do endoderma

Realizamos a análise de enxertia das CTIPDs em quatro órgãos: estômago, intestino, fígado e pulmão. O estômago e intestino são provenientes do intestino primitivo que forma-se

a partir da parte dorsal do saco vitelino incorporado pelo embrião. O endoderma do intestino primitivo dá origem ao revestimento epitelial da maior parte do trato digestório e das passagens biliares, juntamente com o parênquima de suas glândulas, inclusive o fígado e o pâncreas. Os componentes de tecido muscular e conjuntivo do trato digestório são derivados do mesênquima esplâncnico que circunda o intestino primitivo.

O sistema digestório

No sistema digestório foram encontradas nos órgãos: estômago e intestino, as CTIPDs na região das glândulas no seu interior, onde estão localizadas as células parietais e mucosas (Apêndice D - Figura 14 e 15). Além disso, encontra-se em região do nicho de células-tronco intrínsecas glandulares, devido à necessidade de o tecido ser reposto, ou seja, estar em constante descamação do epitélio. As glândulas gástricas localizam-se na lamina própria, que é constituída pelo tecido conjuntivo frouxo, entremeado por fibras musculares lisas, onde também foram encontradas as CTIPDs (Apêndice D - Figuras 14B e C1 e 15C, D). Nas glândulas assim como na musculatura lisa, as CTIPDs adquiriram a morfologia das células do tecido receptor (Apêndice D - Figura 14C, D). As CTIPDs formaram as fibras musculares quiméricas compostas pelas células de cão e humanas, que aparentemente surgiram em resultado da fusão entre células doadoras e receptoras (Apêndice D - Figura 14D e 15D). Porém algumas células desta região não demonstram a mesma fusão e foram encontradas solitárias neste tecido (Apêndice D - Figura 14C e 15D).

Fígado

Nas primeiras semanas de gestação, o saco vitelino é o principal local de hematopoiese. De seis semanas até seis a sete meses de vida fetal em humanos, o fígado (Apêndice E - Figura 16) e o baço (Apêndice E - Figura 24; e Apêndice J - Apêndice 25 e 26) são os principais órgãos envolvidos na produção contínua de células sanguíneas que de acordo com algumas fontes na literatura pode durar até cerca de duas semanas após o nascimento. As CTIPDs-*GFP*⁺ demonstram a enxertia no tecido hepático das células uninucleada (apenas um núcleo) e binucleadas (dois núcleos). Os hepatócitos apresentam o tamanho maior e têm formato poliédrico que medem entre 20-30 µm. Uma das células CTIPDs-*GFP*⁺ é binucleada e apresenta o tamanho de aproximadamente 30 µm (Apêndice E - Figura 16B). Ainda pela técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos contra a proteína *GFP* (Anti-

GFP) e Anti-núcleo humano (HuNu), confirmamos nossos achados (Apêndice E - Figura 17 A, B). Observamos a enxertia das CTIPDs no endotélio dos vasos próximo à túnica íntima a qual é formada por células endoteliais com morfologia achatada (Apêndice E - Figura 17C). Os núcleos do tecido recipiente apresentam o aspecto achatado, quando os núcleos das células humanas são redondos. Sendo assim podemos sugerir nesta mesma figura, que CTIPDs apresentam localização perivascular onde normalmente os pericitos podem ser encontrados. A Figura 17D (Apêndice E) demonstra uma célula de cão trinucleada com o material genético humano dentro dela evidenciado pela transdução positiva com anticorpo HuNu. A enxertia das CTIPD-*GFP* também foram demonstradas utilizando a técnica FISH com sondas específicas de DNA para os seguintes cromossomos autossômicos (CrA) 13 e 18 marcados com fluorocromo verde e vermelho, respectivamente (Apêndice F - Figura 18 A-C). Na Figura 18 C (Apêndice F), demonstramos dois pares dos cromossomos autossômicos, demonstrando ser uma célula humana.

Pulmão

O desenvolvimento do aparelho respiratório fetal é um fenômeno complexo e contínuo, o qual engloba o crescimento e a maturação pulmonar. Nos carnívoros, as estruturas do pulmão tem origem dos folhetos do endoderma e do mesoderma e irão se definindo e especializando-se, sendo divididos em cinco estágios. O estágio embrionário (até os 35 dias gestacionais), pseudoglandular, que se caracteriza pelo desenvolvimento das estruturas vasculares pulmonares, com padrão semelhante ao adulto ao seu final, compreende o período gestacional 35 a 46 dias. Os estágios, canalicular e sacular (ou glandular) (dos 46 aos 56 dias do período gestacional) quando o feto vai se tornando viável, e no pulmão aparecem os ácinos, o tecido epitelial torna-se cada vez mais diferenciado e inicia-se a produção de surfactante pelos pneumócitos tipo II. O estágio sacular (saco terminal), no último terço da gestação, é caracterizado por um rápido aumento no potencial de troca gasosa, o que ultimarà a possibilidade de sobrevivência extrauterina.

No presente trabalho analisamos a enxertia das CTIPDs no tecido pulmonar no último terço do período gestacional do cão que corresponde ao estágio sacular. Observamos a enxertia destas células no parênquima pulmonar e na região dos septos interalveolares, que são sustentados por um delicado estroma de tecido conjuntivo – o interstício pulmonar (Apêndice G - Figura 20-IA). As células apresentam no mínimo dois tipos morfológicos:

endotelial e fibroblasto-símile (Apêndice G - Figura 20-IB). A enxertia das CTIPDs foi também confirmada pela a técnica de FISH. Na Figura 20-IIF (Apêndice G) - demonstramos quatro sinais, 2 verdes e 2 vermelhos, relativos às sondas de DNA para dois autossomos, confirmando o estado diplóide da célula humana.

3.3.2 Tecidos oriundos do mesoderma

Coração

Durante o desenvolvimento fetal no folheto visceral formam-se ilhotas de células mesenquimais que confluem compondo dois tubos endocárdicos próximos a endoderma, que mais tarde se fundem formando um tubo cardíaco único a partir de qual se forma o sistema circulatório. À medida que ocorre a formação do tubo cardíaco tem início o processo de formação dos vasos. Eles surgem basicamente da mesma maneira que os vasos existentes no território extra- embrionário. Células mesenquimais se diferenciam adquirindo forma de tubos cilíndricos apresentando uma luz (Apêndice H - Figura 21-D). Esses tubos se fundem originando os vários vasos do feto. O tecido muscular que forma em proximidade ao epicárdio de coração é chamado tecido muscular estriado cardíaco (Apêndice H - Figura 21). Estes tecidos foram analisados por apresentarem uma enxertia abundante em comparação com outras camadas (endocárdio e pericárdio). Utilização independente dos anticorpos específicos contra as CTIPDs, Anti-*GFP* e Anti-HuNu demonstrou a formação das fibras cardíacas quiméricas cachorro/humano compostas pelas CTIPDs e fibras caninas (Apêndice H - Figura 21 B – C – D e 22 C). Nos vasos os núcleos do tecido recipiente apresentam o aspecto achatado, assim como os núcleos das células humanas, sugerindo que ambas apresentam a morfologia semelhantes às células endoteliais (Apêndice G - Figura 21 D). O estudo histológico dos cortes longitudinais e transversais do miocárdio confirmou que as CTIPDs apresentaram a morfologia cardiomiócitos símile e também foram localizadas ao redor das capilares (Apêndice H - Figuras 22 B).

Tecido Muscular Estriado Esquelético (Bíceps fetal)

O tecido muscular esquelético é composto das fibras, no centro com capilares adjacentes e tecido conjuntivo no perímio circundante também com a extensa rede de

capilares e pequenos vasos sanguíneos (Apêndice I - Figura 23-A). A localização das CTIPDs sugere a sua contribuição na fibra muscular (Apêndice I - Figura 23-B, B1), bem como na região do tecido conjuntivo circundante (Apêndice I - Figura 23-C,C1).

Baço

O baço é um órgão hematopoiético auxiliar. Tem sua origem embrionária iniciada no estágio E12 em camundongos, a partir da fusão endo-mesodérmica da porção externa do estômago. No modelo canino, sua origem permanece controversa, porém a teoria de que a formação se deve pela condensação do mesoderma mesenquimal do lado esquerdo do tubo mesogástrico. Ainda não existe uma clara definição dos fatores envolvidos no processo da organogênese esplênica, mas já foi demonstrado que os fatores Hox11, Wt1, Bapx1 e capsulina são essenciais para a formação e manutenção da homeostasia deste desenvolvimento. Além de desempenhar outras funções na vida adulta, o baço persiste com sua atividade hematopoiética, em camundongos, apesar de estar confinada à eritropoiese.

O baço um dos sítios da hematopoiese embrionária e fetal. O baço tem dois compartimentos: a Polpa Branca Esplênica e a Polpa Vermelha Esplênica (Apêndice I - Figura 24 A - B). A polpa branca esplênica é constituída por cordões irregulares de tecido linfóide denso que se continua com os nódulos ou folículos linfáticos (Apêndice J - Figura 25 A). Encontramos as CTIPDs preferencialmente no estroma da Polpa Vermelha (Apêndice I - Figura 24 C - D). A utilização dos anticorpos Anti-GFP (Apêndice J - Figura 26 E) e Anti-HuNu (Apêndice J - Figura 26 B - D) confirmou este resultado e a presença das CTIPDs na polpa vermelha do baço (Apêndice J - Figura 26 A).

Rim

As estruturas renais surgem a partir de mesoderma intermediário. O blastema metanefrogênico dá origem às partes remanescentes dos néfrons: túbulos proximais e distais, alça de Henle e cápsula de Bowman (Apêndice K - Figura 27 A - B). No período fetal no terceiro período da gestação as CTIPDs foram encontradas nos túbulos revestidos pelo epitélio simples cúbico e nos glomérulos como demonstramos utilizando os métodos da imunofluorescência (Apêndice J - Figura 27 C - D) e imunohistoquímica (Apêndice J - Figura 28 C). A enxertia das CTIPD-GFP no tecido renal fetal, está demonstrado através da imunohistoquímica, utilizando os anticorpos anti-GFP (Apêndice J - Figura 28 A), Anti-

HuNu (Apêndice K - Figura 28 B) e anti-CTIPD (Apêndice K - Figura 28 C) indicados por anéis da cor preta. Na Figura 28-D (Apêndice K), apresentamos o controle da região correspondente.

6.3.3 Tecidos oriundos do ectoderma

Cérebro

A análise histológica e da fluorescência direta demonstrou a presença das CTIPDs-*GFP* na camada molecular da substancia branca (Apêndice L - Figuras 29 A e 30 A e 31 A). As CTIPDs apresentaram a morfologia semelhante aos fibroblastos (Apêndice L - Figura 29B1 e 31B) e formação de clusters (aglomerados celulares) (Apêndice L - Figuras 29 B1 – C e D). Os vasos sanguíneos bem como capilares que penetram todo córtex demonstraram a enxertia das CTIPDs-*GFP* (Apêndice L - Figura 30 D). Este resultado foi confirmado através de transdução positiva utilizando a anticorpo Anti-HuNu (Apêndice M - Figura 31 B – C -D). Detectamos também na área de córtex cerebelar as CTIPDs-*GFP* com a morfologia semelhantes às células de Purkinje com os prolongamentos axônais em evidencia (Apêndice L - Figura 32 A1-3), elaborando arvore dendrítica apical (Apêndice L - Figura 32 A 4).

6.3.4 Tecido extraembrionário

Placenta

Geralmente, a placenta tem sido considerada como um órgão que promove a troca de nutrientes e resíduos entre a mãe e do feto, assim como a proteção mecânica e imunoproteção para o feto, e como um produtor de fatores e hormônios importantes para o crescimento fetal (GUDE *et al.*, 2004). Recentemente foi demonstrado, que em humanos durante do desenvolvimento fetal a placenta contém derivados de progenitores hematopoiéticos imaturos e células-tronco. Além disso, CTM do estroma, isoladas da placenta humana se identificam como células semelhantes aos pericitos e que quando cultivados *in vitro* podem dar suporte a manutenção dos progenitores hematopoiéticos de sangue do cordão humano. Sendo assim, atualmente a placenta ganhou um novo significado sendo considerada como um nicho potente hematopoiético e uma fonte potencial de células-tronco para o futuro da medicina regenerativa (ROBIN *et al.*, 2009).

As CTIPDs demonstraram a migração do peritônio de um feto canino para o tecido-extra-embrionário (Apêndice N - Figura 33). A enxertia das CTIPDs-GFP foi observada na camada muscular arterial (Apêndice N - Figura 33 C) e em região perivascular venosa (Apêndice N - Figura 33 B). O formato achatado das CTIPDs-GFP sugere a sua contribuição no endotélio (Apêndice N - Figura 33 B). Além disso, CTIPDs foram evidenciadas no espaço intervilloso (Apêndice N - Figura 34). As CTIPDs apresentaram morfologia variável das células: há células aparentemente binucleadas (Apêndice O - Figura 35 B), que podem ser o resultado da fusão com as células do tecido recipiente ou de ambas; células endoteliais (Figura 35 C) e as células similares ao pericitos e células redondas semelhantes aos linfócitos com um núcleo grande e pouco citoplasma (Apêndice O - Figura 36 B). Abundantemente as CTIPDs se enxertaram na região endotelial, revestindo vasos da placenta. Na Figura 36 B, C – D (Apêndice O) sugerimos observar a migração desta célula dentro do vaso, com o núcleo deslocado para luz do vaso e corpo celular esticado.

6.4 QUANTIFICAÇÕES DA ENXERTIA, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DAS CTIPDS-GFP⁺ APÓS TRANSPLANTE, REALIZADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.

Após comprovamos a enxertia da CTIPDs nos diversos tecidos derivados de três folhetos embrionários por imunofluorescência indireta utilizando as células marcadas com GFP⁺, por imunofluorescência direta e imunohistoquímica utilizando os anticorpos específicos contra as CTIPDs, proteínas GFP e anti-núcleo humano assim como, a técnica de FISH utilizando as sondas específicas contra cromossomos humanos. As CTIPD foram mantidas no freezer -80°C, descongeladas e injetadas imediatamente.

Logo após de descongelamento das CTIPDs sempre mostram uma boa viabilidade que é próxima a 96-98% verificada por coloração com azul de Tripan (*Trypan blue*). Quando injetadas no tecido fetal as células estão sobre o efeito do ambiente celular onde foram introduzidas. Neste ambiente as células começam migrar e proliferar. Chegando ao local do enxerto as células tem três alternativas: permanecer não diferenciadas, proliferar e diferenciar ou entrar em apoptose, por não serem compatíveis com o ambiente celular do tecido. Portanto para completar os dados da enxertia visamos também quantificar as CTIPDs nas amostras dos tecidos congelados e verificar a sua viabilidade e proliferação. Para tal análise escolhemos

algumas amostras provenientes dos três folhetos embrionários e do tecido extra-embrionário, placenta. Vale pena ressaltar que porcentagem da enxertia nos fragmentos analisados pode não corresponder à mesma das CTIPDs no órgão inteiro.

6.4.1 Quantificação da enxertia das CTIPDs-GFP nos tecidos provenientes do endoderma

Na amostra do tecido pulmonar observamos alta taxa da enxertia medida pela transdução positiva vermelha (Apêndice P - Figura 37). A escolha do anticorpo secundário rodamina, foi para que não houvesse interferência com a fluorescência direta-verde emitida pelas próprias CTIPDs. A taxa da enxertia foi 52,8% observada pela a expressão do Anti-CTIPD e 50,2% do Anti-HuNu anticorpos (Apêndice P - Figura 37 A, B). Em seguida foi analisada a proliferação somente das CTIPDs-GFP⁺ através da análise do seu ciclo celular (Apêndice P - Figura 37 C, D). Esta análise foi realizada pela Citometria de fluxo e revelou, que 53,17% das CTIPDs-GFP⁺ apresentaram o DNA fragmentado, 29,88% estavam nas fases GO/G1 (células quiescentes e em preparação para a síntese do DNA), 8,53% se encontraram no estágio S da síntese do DNA e 8,65 na fase G2 de divisão celular.

6.4.2 Quantificação da enxertia das CTIPDs-GFP nos tecidos provenientes do mesoderma

Escolhemos para a análise tecido muscular estriado esquelético (Bíceps femural) (Apêndice Q - Figura 38 A-D) e também e tecido renal (Figura 38 A-D). A taxa da enxertia medida pela a expressão dos anticorpos Anti-CTIPD e Anti-HuNu foi 34,29 % e 36,86%, respectivamente (Apêndice Q - Figura 38 A, B). A análise do ciclo celular das CTIPDs enxertadas no bíceps femural revelou, que 22,28% apresentaram o DNA fragmentado, 8,82% estavam nas fases GO/G1 (células quiescentes e em preparação para a síntese do DNA), 2,64 % foram no estágio S da síntese do DNA e 31,70% na fase G2 de divisão celular (Apêndice Q - Figura 38 C, D). Quanto ao tecido renal a taxa da enxertia foi 42,3 % (Anti-CTIPD) e 31,3% (Anti-HuNu) (Apêndice R - Figura 39 A, B). A análise do ciclo celular das CTIPDs-GFP⁺ no bíceps femural revelou, que 50,07% apresentaram o DNA fragmentado, 15,92% estavam nas fases GO/G1, 8,97% foram na fase S e 25,25% na fase G2 (Figura 39 C, D).

6.4.3 Quantificação da enxertia das CTIPDs-GFP nos tecidos provenientes do ectoderma

Nas amostras obtidas do tecido cerebral observamos a taxa da enxertia 13,1 % (Anti-CTIPD) e 13,4% (Anti-HuNu) (Apêndice S - Figura 40 A, B). A análise do ciclo celular das CTIPDs-GFP⁺ no cérebro revelou que 8.52% das células apresentaram o DNA fragmentado, 3.24% estavam nas fases G0/G1, 1.29% foram na fase S e 66.59 % na fase G2 (Apêndice S - Figura 40 C, D).

6.4.4 Quantificação da enxertia das CTIPDs-GFP nos tecidos provenientes dos tecidos extraembrionários (placenta)

A cinta placentária dos carnívoros é composta por partes anatomicamente distintas que é uma região central onde se localiza o tecido placentário altamente vascularizado e lateral onde se localiza o hematoma placentário marginal (Apêndice A - Figura 8B d). Do 46º dia até o parto, o tamanho da cintura ultrapassa o desenvolvimento dos hematomas, sinalizando que a fonte de nutrição do feto de cães no terço final de gestação, depende da troca transplacentária, mesmo considerada a atividade fagocitária exercida pelos hematomas (AMBRÓSIO, 2004; MIGLINO et al.; 2006.).

Constatamos a enxertia das CTIPDs em ambas estruturas anatômicas. Quantificamos a enxertia das CTIPDs-GFP⁺ apenas na cinta placentária resultando em enxertia de 64,8% (anti-CTIPD) e 65,6% (Anti-HuNu) (Apêndice T - Figura 41 A, B). Em seguida analisamos a viabilidade e proliferação das CTIPDs na cinta placentária e hematoma placentário separadamente, sendo que estes tecidos apresentam a diferença na sua função e na vascularização do tecido e no final de gestação. Nossos dados indicam que o ambiente e a função do tecido placentário podem ter o efeito na viabilidade e proliferação das CTIPDs (Apêndice T - Figura 41 A-D). A análise do ciclo celular na cinta placentária central revelou, que 21,96% das CTIPDs-GFP⁺ apresentaram o DNA fragmentado, 10,83% estavam nas fases G0/G1, 3,59% foram na fase S e 38,64% na fase G2 (Apêndice T - Figura 41 C). Nos hematomas marginais em relação à cinta placentária central observamos uma taxa mais alta do DNA fragmentado 31,82% e mais baixa nas fases G0/G1, S e G2 que foi 7,40%, 1,63% e 13,13%, respectivamente.

6.5 AVALIAÇÃO DO ESTADO FUNCIONAL DAS CTIPD: NÃO DIFERENCIADAS OU DIFERENCIADAS?

A avaliação do estado funcional das células-tronco humanas após o transplante no modelo animal é de alta relevância e apresenta o próximo nível de complexidade do estudo da ação migratória, capacidade de enxertia, viabilidade celular e proliferação das células-tronco dentro do tecido receptor. O experimento foi desenhado para que estudássemos a enxertia das CTIPDs somente após sete dias que é considerada uma curta permanência dentro do ambiente do tecido fetal. Sendo assim analisamos a expressão alguns marcadores das CET e CTM que as CTIPDs expressam quando cultivadas *in vitro* e também alguns marcadores específicos humanos que poderiam indicar a sua diferenciação.

6.5.1 - Expressão de Oct 3/4 e os marcadores de CTM no tecido muscular

Sabe-se que as CTIPDs expressam Oct3/4 enquanto não são diferenciados (Kerkis et al., 2006). Analisamos a expressão deste marcador no miocárdio fetal canino, devido que no presente estudo as CTIPDs demonstraram uma alta enxertia neste tecido. A análise por imunofluorescência demonstrou a expressão desta proteína nas CTIPDs-GFP e demonstrou a sua localização dentro do núcleo (Apêndice U - Figura 42 A1-A3). O tamanho destas células que é menor do que 5 μ m sugerem que as mesmas apresentam as características e a localização das células miosatélites que também são chamadas de células satélites e são caracterizadas como pequenas células progenitoras mononucleares. A Citometria de fluxo possibilitou quantificar a taxa das CTIPDs-GFP⁺ semelhantes às células miosatélites mononucleares que expressam anti-Oct3/4 anticorpo e que ficou igual a 21,3% na amostra analisada (Apêndice U - Figura 42 A, B). Ao mesmo tempo a taxa da expressão dos marcadores das CTM, assim como, CD146 (pericitos) e β 1-integrina, no mesmo tecido foi muito baixa e ficou em 0,1% e 0,5% respectivamente (Apêndice U - Figura 43 C e D).

Adicionalmente analisamos a expressão destes marcadores no músculo esquelético do bíceps femoral. Observamos a alta taxa da expressão da proteína Oct3/4, CD146 e β 1-integrina que foi igual a 45,4%, 0,4% e 36,7%, respectivamente (Apêndice V-Figura 44 A-C).

6.5.2 Expressão dos marcadores de células diferenciadas no tecido muscular

Ao mesmo tempo avaliamos se as CTIPDs sofreram o processo da diferenciação no tecido muscular do miocárdio. As proteínas Miogenina e Cardiotina expressaram-se nestas células com respectivas taxas de 29,7% e 49,1% (Apêndice W - Figura 45 A e B). O processo de miogênese pode ser dividido em duas fases: determinação e diferenciação. A determinação é o evento em que as células pluripotentes que estão se multiplicando são mobilizadas para o processo miogênico, transformando-se em mioblastos. A diferenciação ocorre quando os genes dos miotúbulos iniciam sua expressão músculo-específica, então os mioblastos param de se multiplicar, e as fibras musculares passam a crescer quase que somente em volume (SCHIERHOLT et al., 2008). A miogenina tem papel importante durante a miogênese, pois sua expressão marca o início da diferenciação, conseqüentemente, quando se expressa a miogenina, as fibras musculares desenvolvem-se a partir dos mioblastos previamente formados.

O anticorpo anti-CK 18, que é um marcador das células epiteliais, utilizamos como o controle “negativo” e conforme esperado observamos sua expressão baixa 4,7% no tecido muscular.

A proteína CD45, que é um marcador dos diferentes tipos das células hematopoiéticas, expressou se nas CTIPDs-FGP⁺ enxertadas no tecido cardíaco. A fim de validar este resultado comparamos a expressão deste marcador nos músculos cardíacos e na aorta do coração onde se espera a mesma ser diferente. Conforme esperado a taxa da expressão do CD45 no músculo cardíaco foi 9,6% contra 19,5% na aorta (Apêndice W - Figura 45 D e E).

O estudo da expressão dos marcadores de células musculares diferenciadas no músculo estriado do bíceps femoral revelou a presença da MyoD1 em 33,87% e Miogenina em 7,5% das células analisadas (Apêndice X - Figura 46 A e B). O marcador CK 18 foi positivo em 7.7% de células, enquanto CD45 em 12% das células analisadas.

6.5.3 - Expressão de Oct 3/4 e marcadores das CTM no tecido placentário

As CTIPDs-GFP⁺ apresentaram a transdução para a proteína Oct 3/4. Na Figura 47 (Apêndice Y) podemos observar que a mesma apresentou a localização nuclear assim como

perinuclear nestas células (Apêndice Y - Figura 47 A3). A taxa das CTIPDs–GFP⁺ que apresentaram a transdução para Oct 3/4 também foi avaliada pela Citometria de Fluxo e foi de 12,6% (Apêndice Y - Figura 48 B). Os marcadores das CTM assim como, CD146 (pericitos) e β 1-integrina, no mesmo tecido foi baixa 2,5 % e 18,3% respectivamente (Apêndice Y - Figura 48 C e D).

6.5.4 Expressão dos macadores das células diferenciadas no tecido placentário

Na Figura 49 A e B (Apêndice Z), podemos observar a expressão das proteínas CD45 em 9,4% e CK18 em 2,3% das células diferenciadas no tecido placentário. A expressão da Miogenina (Apêndice Z - Figura 49 C) foi registrada em 16,6% das células, que é possivelmente corresponde à enxertia das CTIPDs-GFP⁺ ao tecido muscular liso que reveste os vasos placentários.

Avaliamos a expressão dos marcadores das CTM e das CET utilizando a citometria de fluxo. Interessante que não observamos a expressão de CD146 que é um marcador típico dos pericitos. Também não apresentaram a transdução positiva para β -integrina que é uma molécula de adesão que se expressa nas CTM. A expressão de Oct 3/4 foi confirmada apresentando uma taxa de 21,5%.

Verificamos se as células entram no processo de diferenciação durante período de sete dias. Observamos a expressão dos marcadores das células diferenciadas no tecido cardíaco. Utilizando os anticorpos humano-específicos contra miosina e cardiotina comprovamos que CTIPD se diferenciaram (Apêndice Z - Figura 50), sendo encontradas em quantidades distintas 29,2% e 49% respectivamente. Não observamos a expressão de CK18 o que é esperado, pois proteína epitélio específica (controle negativo).

O resultado interessante foi encontrado quando analisamos marcador CD45, que é proteína trans-membrânica de tirosina fosfatase que expressa nos níveis elevados na superfície de todas as células nucleadas hematopoiética e seus precursores. A expressão positiva de CD45 foi observada nas células isoladas das fibras musculares quiméricas humano cão. A expressão positiva para CD45⁺ variou de 9,6% (Apêndice Z - Figura 50 D) no tecido muscular a 16,9% em vasos cardíacos (Apêndice Z - Figura 50 E).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 TERAPIA CELULAR

A nova era na medicina refere-se à regeneração tecidual baseando-se nos avanços dos estudos com as células-tronco. Essa nova terapia promete revolucionar a medicina. O conceito hoje, aceito pela comunidade científica de Terapia Celular, é a utilização de células vivas, capazes de proliferar, diferenciar-se e regenerar o tecido lesado para que o indivíduo seja capaz de reconstruir a função normal do órgão e tecidos.

Em particular, as CTM possuem um potencial de diferenciação de multilinhagem, podendo ser dirigidas para crescerem e se diferenciarem em linhagens celulares específicas, dependendo das condições do microambiente do tecido lesado. Estas características fazem com que estas células possam ter um grande potencial em várias aplicações terapêuticas, como corrigir distúrbios hereditários, refrear inflamações e liberar agentes biológicos. Entretanto, os mecanismos que direcionam as CTM para uma determinada linhagem são em grande parte ainda desconhecidos. Esta situação faz com que as aplicações clínicas e terapêuticas de células-tronco ainda sejam incertas, a não ser que conhecimentos críticos venham a ser obtidos, relativos a vários aspectos, como os sinais que controlam sobrevivência, proliferação e diferenciação, que irão expandir as aplicações terapêuticas potenciais destas células. Além disso, as pesquisas clínicas ainda buscam uma padronização dos procedimentos utilizando as CTM para cada uma das doenças. Esta padronização requer o estabelecimento de protocolos relacionados ao: do tipo celular mais apropriado para o tratamento de cada doença, da dose celular e das vias de aplicação. Entretanto, a utilização da Terapia Celular já é uma realidade, podendo-se constatar muitos resultados positivos já publicados, tanto na Medicina Humana quanto na Medicina Veterinária. O transplante de medula óssea, por exemplo, iniciou-se no final da segunda guerra mundial, e hoje vem beneficiando milhares de pessoas.

7.2 MODELO CANINO

Estudos iniciais sobre transplante de células-tronco em cães como intervenção terapêutica para doenças na medicina veterinária foram realizados por Appelbaum et al. (1986). Dentre os modelos animais experimentais, o canino nos parece permite melhor

avaliação clínica, assim como, maiores facilidades na colheita e transplante (THOMAS, 1999). Além disso, modelos experimentais em cães têm propiciado a obtenção de informações importantes no transplante de células progenitoras hematopoéticas autólogas e alogênicas (WAGNER; STORB, 1996). Os estudos de Krause et al. (1994); McSweeney et al. (1998); Ratajczak et al. (1998) e Bruno et al. (1999) com células tronco hematopoiéticas (CTH) de cães, revelaram-se que o modelo canino é aplicável ao estudo de CT já que em suas pesquisas os cães revelaram-se fenotipicamente e funcionalmente semelhante às CT de humanos e camundongos (apud WENCESLAU et al., 2011), permitindo a transposição destes achados experimentais para os seres humanos no futuro.

Lupu e Storb (2007) referem vantagens no uso do cão como modelo experimental partindo-se do princípio de que estes animais possuem longo tempo de vida em relação a outros modelos, possuem grande diversidade genética, possuem naturalmente doenças semelhantes ao homem e são clinicamente bem reconhecidos. Graças a estas características podem ser utilizados em pesquisas que posteriormente sejam extrapoladas ao uso clínico em humanos. A exemplo, temos as pesquisas realizadas em 1889 por Mering y Mikowski, que descobriram um tratamento para Diabetes Mellitus através de experiências de pancreatemia em cães.

7.3 A TÉCNICA DE TUI E APLICAÇÃO DAS CT EM MODELO CANINO

A aplicação intrauterina de CT já está sendo utilizada como o método de tratamento de doenças genéticas, congênitas, hematológicas e imunológicas em humanos após diagnóstico pré-natal do líquido amniótico ou pelo sangue da mãe, utilizando testes imunogenéticos (WESTGREEN, 2006). O ambiente fetal imunologicamente imaturo portanto, tolerante a antígenos externos. O feto em desenvolvimento se tornou um modelo para estudar a dinâmica de migração, enxertia e estado funcional de tipos diversos de células-tronco, tais como: CTH (BM-CTM fetais), combinação entre CTM e CTH (MÉNDEZ-FERRER et al., 2010) e mais recentemente das CTM de origem dos tecidos pós-natais e adultos.

As principais vias de acesso utilizadas para a injeção intrauterina de células-tronco são: Via trans-percutânea ou após a exposição do útero por laparotomia exploratória, associada a: Via Intra-placentária, ou Via Intraperitoneal, ou Via artéria uterina, ou Via

Porta-hepática, ou Via Umbilical, ou Via inter-placentária ou Via intra-celômica. Estas vias, por sua vez, necessitam de ferramentas para sua utilização, a mais comumente utilizada é a guiada por US (ultrasson), ou por Laparoscopia, ou Fetoscopia (utilizado principalmente nos modelos caprinos e suínos) (SANTOLAYA-FORGAS, 2007).

No presente estudo utilizamos a via Intra-peritoneal. com laparotomia exploratória no terceiro terço de gestação da cachorra o que corresponde aproximadamente 45 dias. Não observamos complicações no procedimento cirúrgico adotado o que nos leva a crer que estabelecemos o protocolo seguro para esta técnica em cão. No segundo momento operatório também não houve complicações e a mãe está bem até a presente data.

7.4 PERÍODO GESTACIONAL E TRANSPLANTE DAS CÉLULAS-TRONCO

O período gestacional pode ser dividido em três terços gestacionais (sendo 0 a 20 o primeiro terço, de 21 a 40 o segundo terço e de 41 a 60 dias o terceiro terço gestacional) que não são equivalentes funcionalmente, portanto a escolha do período gestacional onde as células-tronco serão aplicadas pode influenciar seu comportamento de migração, proliferação, capacidade de enxertia e de diferenciação. Vale salientar que até os 35 dias gestacionais, modelo canino ainda é considerado embrião.

Para esta pesquisa utilizamos no terceiro terço gestacional, semelhante a Blakemore et al. (2004), já que o objetivo é o estudo da biodistribuição de célula tronco transplantada a partir da cavidade peritoneal no feto sadio. De acordo com Pretzer (2008) a partir dos 40 dias de idade gestacional, o feto apresenta todos seus órgãos já formados, bem como seu desenvolvimento vascular, possibilitando uma perfeita migração das células através de seus vasos.

7.5 CTIPDS E SUAS VANTAGENS PARA TUI

Descrevemos detalhadamente as características principais destas células na introdução, portanto aqui somente iremos destacar algumas vantagens das CTIPDs. Estas vantagens são: auto-renovação, alta capacidade de proliferação, ampla capacidade de diferenciação,

capacidade migratória dentro de tecidos e órgãos, e geração dos tecidos quiméricos através da enxertia incorporando-se e colaborando com o ambiente enxertado, e incapacidade de formar teratomas (KERKIS et al., 2006; KERKIS et al., 2009; MENDONÇA COSTA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; GOMES et al., 2010; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011).

O estudo realizado por nos anteriormente em camundongos adultos jovens, revelou uma alta capacidade migratória, proliferativa e a capacidade de diferenciação destas células (KERKIS et al., 2006). Por outro, o nosso grupo também demonstrou a capacidade migratória, proliferativa, imunocompatibilidade, a enxertia e a diferenciação destas células em modelo de camundongo (Xenotransplante) através de formação das quimeras antes do nascimento humano/camundongo após a injeção das CTIPDs dentro de blastocisto. Este estudo revelou que as CTIPDs foram compatíveis *in vitro* com embriões de camundongo permitindo seu perfeito desenvolvimento e imunocompatíveis com o ambiente embrionário e fetal de camundongo *in vivo*. As CTIPDs enxertadas foram capazes de contribuir significativamente formando os clusters de células humanas nos diferentes tecidos de animal durante o desenvolvimento embrionário assim como nas fases mais avançadas do desenvolvimento. CTIPDs também foram capazes de se diferenciar produzindo as proteínas humanas apropriadas ao tecido da enxertia. (FONSECA et al., 2009).

O presente projeto visou preencher uma lacuna no nosso conhecimento sobre o comportamento destas células durante a vida fetal principalmente no momento quando os órgãos são formados e o feto está num estágio de crescimento rápido. Definimos como hipótese, que a alta taxa de enxertia e proliferação das CT pode e deve depender como das características das células-tronco utilizadas, quanto do ambiente onde elas foram introduzidas. Quanto às características das células-tronco temos que avaliar a sua imaturidade, ou seja, o padrão de expressão dos marcadores de CT e capacidade de diferenciação, que por sua vez irá depender da origem embrionária do tecido que foi utilizado como uma fonte para obtenção destas células e a técnica do isolamento e manuseio posterior das mesmas. Por exemplo, a SHED (MIURA et al., 2003) e CTIPDs (KERKIS et al., 2006, 2009, 2011).

Polpa dentária se origina das células-tronco pós-migratórias da crista neural (CTCN), que são células pluripotentes. CTCN é uma população de células migratórias, capazes de se diferenciar em um vasto espectro de tipos de células durante o desenvolvimento dos mamíferos, como a glia, neurônios, ossos, tendões, os melanócitos, condrócitos, células endócrinas e tecido adiposo (NIKOLOVA; STRILIC; LAMMERT, 2007; SORREL;

CAPLAN, 2010) Embora a pluripotência das CTCN se tornasse mais restrita durante o desenvolvimento, as células homólogas pós-natais mantêm a capacidade de auto-renovação e demonstram um potencial de desenvolvimento quase semelhante às CTCN e às CET (PHINNEY; PROCKOP, 2010). Origem embrionária das CTIPDs sugere que estas células são semelhantes às CTCN.

Para verificar esta hipótese avaliamos a biodistribuição das CTIPDs marcadas com GFP em fetos caninos no final da gestação. Sete dias após do TIU das CTIPDs-GFP⁺ realizamos a Ovario-salpingo-histerectomia do animal. Os órgãos foram inspecionados a fim de obter informações sobre possíveis alterações dos mesmos, então cada feto foi retirado de seu saco gestacional cuidadosamente observando coloração e viscosidade dos líquidos fetais bem como da morfologia externa de sua placenta. Então iniciamos a necrópsia com coleta e isolamento dos tecidos e órgãos para as análises: histológica básica e para a microscopia Confocal. De acordo com trabalhos anteriores, aparentemente não observamos alterações macroscópicas após a aplicação das CTIPD geneticamente modificadas (BLAKEMORE et al., 2007). Os estudos histológicos também não apresentaram alterações visíveis.

7.6 ANÁLISES COMPARATIVAS DOS RESULTADOS OBTIDOS COM CTIPDS-GFP⁺ E OUTROS TIPOS DE CTM

Liechty et al., (2000), que utilizaram BM-CTM humanas bem caracterizadas em ovelha que foram aplicadas no início da gestação. Deste estudo demonstrou a longa persistência e diferenciação de células humanas no tecido animal, assim como demonstrou suas únicas características imunológicas, porém a taxa de enxertia foi... (ALMEIDA-PORADA et al., 1996a, b, 2002; LIECHTY et al., 2000, MACKENZIE; FLAKE (2001a, b, 2002). Primeiro analisamos a enxertia e diferenciação das CTIPDs após curto prazo de aplicação. Estes resultados são essenciais para compreender a dinâmica de migração e de distribuição das CT após TUI. Aplicamos células no final do período gestacional, o que não é mais um período tão imunoprevilegiado. Mesmo assim os cortes seriados que estudamos não apresentaram os sinais de infiltração linfática nos tecidos (ver figuras histológicas), sugerindo que CTIPDs apresentam no ambiente fetal as mesmas características imunológicas do que BM-CTM (LIECHTY et al., 2000) e que já foram descritas em nossos trabalhos anteriormente

(KERKIS et al., 2006; KERKIS et al., 2009; MENDONÇA COSTA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; GOMES et al., 2010).

Outro grupo usou o transplante alogênico de BM-CTM em útero de ovelha no 14º dia de gestação, porém o mesmo também resultou em baixo nível de quimerismo, mas demonstrou o enxerto em múltiplos órgãos (SCHOEBERLEIN et al., 2005).

O presente estudo esta de acordo com um estudo recente (CHOU et al., 2006) que utilizou as BM-CTM humanas e TUI em camundongo no 3º período de gestação. BM-CTM humanas demonstraram a enxertia nos tecidos derivados dos três folhetos embrionários. Importante mencionar, que BM-CTM apresentaram também a transdução positiva para o anticorpo CD45 (marcador de linfócitos humanos). Esta CD45+ células foram detectadas no sangue periférico do camundongo. Igualmente observamos a presença das CTIPDs CD45 positivas no tecido muscular no vaso do coração, no biceps, placenta e testículos (dado não apresentado). Estes dados reforçam o achado de Chou e co-autores (2006) que sugeriu que a população das CTM pode conter células precursoras hematopoiéticas capazes dentro de um ambiente apropriado se diferenciarem em células sanguíneas. Os nossos dados sugerem que esta propriedade das CTM não esta restrita as BM-CTM e pode observada nas células derivadas das outras origens.

Para investigar a sua utilidade em modelo de desenvolvimento cardíaco em mamíferos BM-CTM de origem adulta e fetal foram injetadas, via intraperitoneal, em fetos de ovelhas. Curioso, que a maioria das células de origem humana enxertou-se nas fibras de Purkinje. Aproximadamente 43,2% de fibras de Purkinje eram de origem humana, em contraste, somente 0,01% dos cardiomiócitos eram de origem das BM-CTM (AIREY et al., 2004). Evidenciamos uma enxertia das CTIPDs nas fibras musculares de miocárdio sobrepondo se com a localização de cardiomiócitos. Estas CTIPDs expressaram a miosina e cardiotina sugerindo a sua diferenciação. Precisamos analisar estas lâminas com auxílio de patologista para poder concluir definitivamente o sítio da enxertia das CTIPDs no tecido cardíaco.

Vale pena mencionar que nosso estudo e o trabalho do Airey et al. (2004) apresentam uma taxa muito alta da enxertia quando comparado com demais estudos. Podemos sugerir que a taxa alta da enxertia pode depender da qualidade de células (imunofenótipo, imaturidade, proliferação), idade gestacional (nível do hormônios, dinâmica do crescimento do feto, dinâmica do crescimento dos órgão e tecidos), da quantia das células e da espécie (BLAKEMORE et al., 2004).

7.7 TRÁFEGO TRANSPLACENTÁRIO DAS CTIPDS

Diferentes tipos das CTM obtidas dos tecidos adultos e fetais forma utilizadas para investigar o tráfego transplacentário de células durante a gravidez (O'DONOGHUE et al., 2008; TROEGER et al., 2010). Em todos os trabalhos realizados foi observado um microquimerismo que aparentemente depende da idade gestacional. Neste trabalho a maioria das células injetadas foi encontrada principalmente na placenta, porem conforme esperado poucas células foram encontradas também no sitio da laparotomia.

As CTIPD também apresentaram a migração para o tecido placentário. Podemos supor que uma vez que a placenta e considerada uma dois maiores territórios hematopoiéticos dentre dos tecidos fetais, as CTIPDs devido as suas características foram atraídas pela quimiotaxia (vaso-taxia) positiva e migram através do sistema circulatório fetal para a mesma. Ainda falta muito para compreender o mecanismo como as células sentem e trafegam para o local do interesse delas. Observamos as CTIPDs dentro dos vaso que apresentaram o fenótipo das células migratórias com o núcleo deslocado e a citoplasma esticada (Apêndice O - Figura 35). Porém as mesmas foram encontradas também no próprio tecido placentário – estroma (Apêndice O - Figura 36).

7.8 CAPACIDADE PROLIFERATIVA E AS TAXAS DA ENXERTIA DAS CTIPDS EM TECIDOS FETAL DE CÃO

Nós pela primeira vez avaliamos a capacidade de proliferação das CT de origem mesenquimal através do estudo do seu ciclo celular após a injeção e permanência no tecido. Observamos que dependendo do órgão as taxas das CTIPD com DNA fragmentado, as CTIPD que estão nos demais fases do ciclo celular variam entre os diferentes órgãos significativamente, como por exemplo o Tecido muscular e o Rim (Apêndice Q - Figuras 38 e Apêndice R – Figura 39). Os nossos dados do ciclo celular das CTIPDs obtidas em cinto placentário e hematoma placentário marginal sugerem que sua proliferação depende do ambiente tecidual. O hematoma placentário marginal é um tecido que esta em degradação no ultimo trimestre da gestação de cão. Sendo assim a taxa da proliferação das CTIPDs caculada pelo número das células que estão na fase S e G2 e bem menor que a mesma nas CTIPDs

localizadas na cinta placentária central (Apêndice T - Figura 41). De uma forma geral observamos alta enxertia e proliferação das CTIPDs nos seguintes órgãos: coração, bíceps femoral (dados não apresentados). Estes dados requerem também uma análise molecular mais profunda que realizando atualmente.

Interessante que em comparação com BN-CTM e CTIPDs as CTM humanas derivadas de âmnio e placenta também utilizadas no TIU em modelo animal, embora se localizassem em diferentes órgãos dos organismos estudados apresentaram o nível baixo da enxertia (HAN et al., 2008, CHEN et al., 2009, SHAW et al., 2010). Estes resultados questionam as qualidades das células utilizadas ou a sua capacidade de diferenciação. Nos grupo demonstrou que células progenitoras isoladas dos tecidos fetais do cão assim como, BM, fígado e saco vitelino e que são semelhantes às CTM altas pelos critérios morfológicas e expressão dos marcadores das CTM, apresentam a capacidade de diferenciação *in vitro*, mas restrita do que CTM adultas (WENCESLAU et al., 2011).

Muotri et al. (2005) estudaram a enxertia e diferenciação das CTE humanas após TIU destas células no 14º dia de gestação em camundongo no ventrículo lateral do cérebro. Apesar de que as CET foram capazes de se diferenciar em neurônios funcionais *in vivo* o enxerto destas no cérebro foi baixo > 0,1% quando comparado com as CTIPDs enxertadas no cérebro de cão e que foi medido pela a expressão de anticorpo anti-Oct 3/ 4 (dado não apresentado).

7.9 EXPRESSÃO DE OCT3/4 E MARCADORES DE CTM EM CTIPDS APÓS A ENXERTIA

Pela primeira vez demonstramos a expressão de marcador Oct3/4 nas CTIPDs após a TUI. Marcante que as CTIPDs que expressam este marcador se localizaram na posição do células satélite musculares. Podemos inferir que i) as CTIPDs que propriamente expressam este marcador migraram para o ambiente que consideraram da sua origem, ou ii) ou estas e alguns outras mais imaturas da população das CTIPDs injetadas foram reprogramadas pelo ambiente da enxertia. Importante observar que elas foram capazes de proliferar, pois a taxa da enxertia aparece ser alta (Apêndice U – Figura 43). As CTIPDs que expressam Oct3/4 foram encontradas nos outros órgão também no bíceps femoral e no sitio placentário onde se localizam as de origem hematopoiética em desenvolvimento (Apêndice V – Figura 44). .

Acredita-se atualmente que o nicho da BM-MSc é vascular (MENDEZ-FERRER et al., 2010). Maioria dos trabalhos demonstra que o local preferencial destas células é a parede do vaso e que um marcador típico destas células é CD146 que é conhecido como as do pericitos. Acreditamos que as CTIPDs tendo uma origem da crista neural são semelhantes mas iguais as das BM-MSc. Numa população das CTIPDs diferente do SHED foi observada uma taxa mais baixa de expressão das CD146. Porém todas as CTIPDs (~98%) expressam também o marcador Nestin sugerindo que estas células ao mesmo tempo são comprometidas com a linhagem neuroepitelial. Portanto, acordamos que injetadas *in vivo* as CTIPDs começam expressar a sua capacidade neuroepitelial e provavelmente irão ocupar outro nicho qualquer, que não é somente perivascular. Verificamos a expressão de CD146 nestas células após a injeção e permanência no tecido fetal do cão ((Apêndice Z – Figura 48). Conforme já esperávamos a expressão do CD146 foi muito baixa (Apêndice U - Figura 43). Ao contrário do CD146, a β 1-integrina, que entre outros marcadores é considerada um marcador de células-tronco límbicas semelhante às CTIPDs (MONTEIRO et al., 2010). A célula-tronco límbica assim como CTIPD prove da crista neural. β 1-integrina expressou nas CTIPDs em diferentes tecidos (Apêndice T, V e Z - Figura 42, 44 e 48). Além disso, β 1-integrina se expressa especificamente no músculo estriado (esquelético e cardíaco) exatamente como foi observado em nossos resultados.

7.10 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DA DIFERENCIAÇÃO EM CTIPDS APÓS A ENXERTIA

Apesar de um curto tempo de permanência das CTIPDs nos tecido fetal após TUI, as mesmas apresentaram a diferenciação que foi analisada através da análise da expressão dos marcadores apropriadas para cada um tecido.

No músculo cardíaco avaliamos a expressão da Miogenina bem como da cardiotina. Conforme a sequência da expressão destes marcadores durante determinação do destino celular (*cell fate*) das células musculares expressa se inicialmente a proteína MyoD1 e posteriormente a Miogenina o que foi observado nos resultados (Apêndice - Figura 42, 44) No músculo estriado esquelético o taxa das células que expressam MyoD1 é maior do que Miogenina sugerindo ainda o início do processo da diferenciação muscular. Quanto a

Cardiotina uma proteína específica para músculo estriado cardíaco, a mesma se expressou em maior taxa das células quando comparada com Miogenina (Apêndice - Figura 45).

Acima já discutimos a expressão da proteína humana CD45 nos tecidos fetais cardíacos e na placenta. Podemos atribuir estes resultados a presença do sangue nos tecidos analisados, sendo que observou-se a taxa maior das CTIPDs-CD45+ na aorta (16,95) quando comparado com miocárdio (9,6%), no bíceps (12,0%) e na placenta (9,4%).

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1. Foi estabelecido o protocolo da transdução de CTIPD com a proteína verde fluorescente (GFP – *green fluorescence protein*) o que permitiu de rastreá-las nos tecidos dos fetos caninos após TUI.
2. Foi estabelecido um protocolo para o TIU de CTIPD humanas no último terço da gestação em cães sem raça definida.
3. Analisamos histologicamente a enxertia nos tecidos fetais a fim de detectar as possíveis consequências do enxerto das CTIPD-GFP⁺ sete dias após o TIU.
4. Analisamos a migração, a proliferação e a biodistribuição das CTIPD-GFP⁺ em tecidos derivados dos três folhetos embrionários, após a injeção intraperitoneal destas células em fetos caninos, através da análise por Microscopia Confocal (Método de Fluorescência Direta).
5. Confirmamos a enxertia, o comportamento migratório, a biodistribuição e a pluripotência das CTIPD-GFP⁺ utilizando métodos de IF (imunofluorescência), IHQ (imunohistoquímica) e análise por FISH (*hibridização fluorescente in situ*) com sondas de DNA que reconhecem e se hibridizam com sua sequência complementar nos cromossomos humanos 13, 18 e 21.
6. Quantificamos o enxerto das CTIPD-GFP⁺ nos tecidos analisados e verificar o estado funcional (indiferenciado ou diferenciado) das CTIPD-GFP⁺ por transdução com anticorpos apropriados por Citometria de Fluxo.
7. Analisamos o enxerto, a migração, a biodistribuição e a pluripotência das CTIPD-GFP⁺ no tecido placentário – folheto extraembrionário utilizando os métodos acima citados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AFANASYEV BV, ELSTNER EE, ZANDER AR. A. J. Friedenstein founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cellular Therapy and Transplantation**, v.1, n. 4, p. 35-38, 2010. www.ctt-journal.com

AIREY JA.; ALMEIDA-PORADA G; COLLETTI EJ; PORADA CD; CHAMBERLAIN J; MOVSESIAN M; SUTKO JL; ZANJANI ED. Human Mesenchymal Stem Cells Form Purkinje Fibers. **Fetal Sheep Heart Circulation**, v.109, p.1401-1407, 2004.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; LIMA, A. R.; MARTINS, D. D. S.; ASSIS-NETO, A. C.; BONATELLI, M.; VERECHIA, F. T.; CARVALHO, A. F. D. Fissura placentária de gatas SRD, *Felis catus* - Linnaeus, 1758: Aspectos macro e microscópicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p. 81-85, 2004.

ANKER PS, NOORT WA, SCHERJON SA, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, KRUISSELBRINK AB, VAN BEZOOIJEN RL, BEEKHUIZEN W, WILLEMZE R, KANHAI HH, FIBBE WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, v.88, p.845-52, 2003.

BARKER JE, DEVEAU S, LESSARD M, HAMBLIN N, VOGLER C, LEVY B. In utero fetal liver cell transplantation without toxic irradiation alleviates lysosomal storage in mice with mucopolysaccharidosis type VII. **Blood Cells Molecular Dis.** Sep-Oct; v.27, n.5, p. 861-73, 2001.

BELTRÃO-BRAGA PCB, PIGNATARI GC, MAIORKA PC, OLIVEIRA NAJ, LIZIER NF, WENCESLAU C.V, MIGLINO M. A., MUOTRI A. R., KERKIS I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell Transplantation**, 2011. In press.

BIEBACK K, KERN S, KLUTER H, EICHLER H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem Cells**. v.22, p.625-34, 2004

BJORNSON CR, RIETZE RL, REYNOLDS BA, MAGLI MC, VESCOVI AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science**. v. 283, p. 534-537, 1999.

BLAKEMORE K., HATTENBURG C., STETTEN G., BERG K., SOUTH S., MURPHY K., JONES R. In utero hematopoietic stem cell transplantation with haploidentical donor adult bone marrow in a canine model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 190, p. 960-73, 2004

BRAZELTON TR, ROSSI FMV, KESHET GI, BLAU HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science**, v.290, p.1775-1779, 2000.

BRUDER SP, JAISWAL N, RICALTON NS, MOSCA JD, KRAUS KH, KADIYALA S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. **Clinic Orthopaedics**, v.355-S, p.247-56, 1998.

CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research Society**, September v.9, n. 5, p.641-50, 1991.

CAPLAN AI. Mesenchymal Stem Cells, In: **Handbook of Stem Cells**, Academic Press, v.2, p. 299-308, 2004.

CAPLAN AI, DENNIS JE. [Mesenchymal stem cells as trophic mediators](#). **Journal Cell Biochemistry**, August, v. 98, n. 5, p. 1076-84, 2006

CAPLAN AI. [All MSCs are pericytes?](#) **Cell Stem Cell**, Sep, v. 3, n. 3, p.229-30, 2008

CAPLAN AI. [Why are MSCs therapeutic? New data: new insight](#). **Journal of Pathology**, Jan; v. 217, n. 2, p.318-24, 2009.

CAPLAN AI.; CORREA D. PDGF in bone formation and regeneration: New insights into a novel mechanism involving MSCs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, p. 1795–1803, 2011.

CHAN JL, TANG KC, PATEL AP, BONILLA LM, PIEROBON N, PONZIO NM, RAMESHWAR P. Antigen presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . **Blood**, v.107, p.4817-24, 2006.

CHEN CP, LEE MY, HUANG JP, APLIN JD, WU YH, HU CS, CHEN PC, LI H, HWANG SM, LIU SH. Trafficking of multipotent mesenchymal stromal cells from maternal circulation through the placenta involves vascular endothelial growth factor receptor-1 and integrins. **Stem Cells**, v. 26, p. 550–561, 2008.

CHEN CP, LIU SH, HUANG JP, APLIN JD, WU YH, CHEN PC, HU CS, KO CC, LEE MY, CHEN CY. Engraftment potential of human placenta-derived mesenchymal stem cells after in utero transplantation in rats. **Human Reproduction**, January, v.24, n.1, p.154-65, 2009.

CHOU SH, KUO TK, LIU M, LEE OK. In utero transplantation of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells in mice. **Journal of Orthopaedic Research**, March, v. 24, n. 3, p.301-12, 2006.

CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, v. 288, p. 1660-1663, 2000.

DIGIROLAMO CM, STOKES D, COLTER D, PHINNEY DG, CLASS R, PROCKOP DJ. 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. **Br Journal of Haematology**, v.107, p.275-81, 1999.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

ENGLAND, G., YEAGER, A. AND CONCANNON, P.W. Imagenología ultrasonográfica del aparato reproductor de la hembra. In: Concannon P.W., England G., Verstegen III J., et al. (Eds.), **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), 2003; Document No. A1203.0703.ES.

EVANS MJ, KAUFMAN MH. [Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos](#). **Nature**. July, v. 9, n. 292(5819), p.154-6, 1981.

FEITOSA ML, FADEL L, BELTRÃO-BRAGA PC, WENCESLAU CV, KERKIS I, KERKIS A, BIRGEL J EH, MARTINS JF, MARTINS D S, MIGLINO MA, AMBRÓSIO CE. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 5, p.416-22, 2010.

FLAKE AW, ZANJANI ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: a status report. **The Journal of American Medical Association**, v. 278, p. 932-7, 1997.

FLAKE AW, ZANJANI ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation: ontogenic opportunities and biologic barriers. **Blood**, v. 94, n. 7, p. 2179-91, 1999.

Flake AW. In utero stem cell transplantation. **Best Practice & Research Clinical Obstetric Gynaecology**, December, v. 18, n. 6, p. 941-58, 2004.

FLEISCHMAN RA, MINTZ B. [Development of adult bone marrow stem cells in H-2-compatible and incompatible mouse fetuses](#). **J Exp Med**. 1984 Mar 1;159(3):731-45.

FONSECA S. A. S, ABDELMASSIH S, DE MELLO CINTRA LAVAGNOLLI T, SERAFIM RC, SANTOS E. J. C.; MOTA MENDES C, DE SOUZA PEREIRA V, AMBROSIO CE, MIGLINO MA, VISINTIN JA, ABDELMASSIH R, KERKIS A, KERKIS I. Human immature dental pulp stem cells contribution to developing mouse embryos: production of human/mouse preterm chimaeras. **Cell Proliferation**, April, v.42, n. 2, p.132-40, 2009.

FRIEDENSTEIN A. J; GORSKAJA J. F; KULAGINA N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematological**, v.; 4, n. 5, p. 267-74, 1976.

FRIEDENSTEIN A. J; PLATEZKY-SHAPIO II; PETRAKOVA K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow. **Journal Embryology Experimental Morphology**, v. 16, p. 381-90, 1996.

GOMES JA, GERALDES MONTEIRO B, MELO GB, SMITH RL, CAVENAGHI PEREIRA DA SILVA M, LIZIER NF, KERKIS A, CERRUTI H, KERKIS I. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp

stem cells. **Investigation of Ophthalmology & Visual Science**, March, v. 51, n. 3, p.1408-14, 2010.

GUILLOT P. V.; ABASS O.; BASSETT J. H. D.; SHEFELBINE S. J.; BOU-GHARIOS G.; CHAN J.; KURATA H.; WILLIAMS G. R.; POLAK J.; FISK N. M. Intra-uterine transplantation of human fetal mesenchymal stem cells from first trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. **Medicina - Buenos Aires**, v. 67, n. 4, p.389-95, 2007.

GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF, KUNKEL LM, MULLIGAN RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, v. 401, p. 390-394, 1999.

HEFFNER JL, OGLES BM, GOLD E, MARSDEN K, JOHNSON M. Nutrition and eating in female college athletes: a survey of coaches. **Eating Disorders** Fall, v.11, n. 3, p. 209-20, 2003.

HU Y, LIA L, WANG Q, MA L, MA G, JIANG X, ZHAO RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v. 141, p. 342-49, 2003.

JACKSON KA, MI, T, GOODELL MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proceeding of the National Academy Science U S A**, v. 96, p. 14482-86, 1999.

JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B.N., REINHARDT, R.L., SCHWARTZ, R.E., KEENE, C.D., ORTIZ-GONZALEZ, X.R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W.C., LARGAESPADA, D.A., VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature** v. 418, p. 41-49, 2002.

KERKIS, I., KERKIS, A., DOZORTSEV, D., STUTKART-PARSON, G.C., MASSIRONI, A.M.G., PEREIRA, L.V., CAPLAN, A.I., CERRUTI, H.F. **Isolation and Characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers**. *Cells Tissues Organs* (2006) 184, 105-116.

KERKIS I, AMBROSIO CE, KERKIS A, MARTINS DS, ZUCCONI E, FONSECA SA, CABRAL RM, MARANDUBA CM, GAIAD TP, MORINI AC, VIEIRA NM, BROLIO MP, SANT'ANNA OA, MIGLINO MA, ZATZ M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **Jornal of Translation Medicine**, v. 3, p.6-35, 2008.

KERKIS I, LOBO SE, KERKIS A. Dental pulp stem cells and perspectives of future application in cell therapy. In: **Stem Cells. Basic and Applications**. Ed. Deb KD & Totel SM. Tata McGraw Hill p.426-438, 2009.

KERKIS I, CAPLAN AI. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue Engineer - Part B Review**. April, v.18, n. 2, p.129-38, 2012.

KERN S, EICHLER H, STOEVE J, KLUTER H, BIEBACK K, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, p.1294-301, 2006.

KOPPANATI BM, LI J, XIAO X, CLEMENS PR. Systemic delivery of AAV8 In utero results in gene expression in diaphragm and limb muscle: treatment implications for muscle disorders. **Gene Therapy** v.16, p.1130–1137, 2009.

LE BLANC K; LE BLANC K, GÖTHERSTRÖM C, RINGDÉN O, HASSAN M, MCMAHON R, HORWITZ E, ANNEREN G, AXELSSON O, NUNN J, EWALD U, NORDÉN-LINDEBERG S, JANSSON M, DALTON A, ASTRÖM E, WESTGREN M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**. June, 15;v. 79, n. 11, p. 1607-14, 2005.

LE DOUARIN, N.M. DUPIN. Multipotentiality of the neural crest. *Current Opinion Genetic Development*, v. 13, n. 5, p.529–36, 2003.

LE DOUARIN, N.M. CREUZET, S. COULY, G. DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**; 131(19): 4637-50, 2004

LE DOUARIN, N.M. CALLONI, G.W. DUPIN, E. The stem cells of the neural crest. **Cell Cycle**, v. 7, n. 8, p. 1013–9, 2008.

LEMISCHKA IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1044:132-8).

LIECHTY, K.W., MACKENZIE, T.C., SHAABAN, A.F., RADU, A., MOSELEY, A.B., DEANS, R., MARSHAK, D.R., FLAKE, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after *in utero* transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, p. 1282-1286, 2000.

LUPU M, STORB R. Five decades of progress in haematopoietic cell transplantation based on the preclinical canine model. **Veterinary Comparative Oncology**, v.5, n.1, p.14-30, 2007.

MACKENZIE TC, FLAKE AW. Human mesenchymal stem cells: insights from a surrogate in vivo assay system. **Cells Tissues Organs**, v.171, n. 1, p. 90-5, 2002.

MACKENZIE TC, SHAABAN AF, RADU A, FLAKE AW. Engraftment of bone marrow and fetal liver cells after in utero transplantation in MDX mice. **Journal of Pediatric Surgery**, July, v.37, n.7, p.1058-64, 2002.

MAFI P, HINDOCHA S, MAFI R, GRIFFIN M, KHAN WS. Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization – A Systematic Review of the Literature. **The Open Orthopaedics Journal**, , v.5, p. 253-260 (Suppl 2-M4) 2011.

MARTIN GR. [Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.](#) **Proceedings National Academic Science U S A**. December, v.78, n.12, p.7634-8, 1981.

MARON-GUTIERREZ, T.; ARAUJO, I.; MORALES, M. M.; GARCIA, C. S. N. B.; ROCCO, P. R. M. Terapia com células-tronco na síndrome do desconforto respiratório agudo. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, p. 51-57, 2009.

MEIRELLES LS, CHAGASTELLES PC, NARDI NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal Cell Science**, v. 119, p. (Pt 11):2204-13, 2006.

MENDONÇA COSTA A, BUENO DF, MARTINS MT, KERKIS I, KERKIS A, FANGANIELLO RD, CERRUTI H, ALONSO N, PASSOS-BUENO MR. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **Journal of Craniofacial Surgery**, Jan; v. 19, n. 1, p. 204-10, 2008.

MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, SHI S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings National Academic Science U S A**, v. 100, p.5807-12, 2003.

MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MC-KERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 290, p. 1779-1782, 2000.

MORENO R, MARTINEZ-GONZALEZ I, ROSAL M, NADAL M, PETRIZ J, GRATACOS E, ARAN JM. Fetal Liver-Derived Mesenchymal Stem Cell Engraftment After Allogeneic In Utero Transplantation into Rabbits. **Stem cells and Development** April, p. 1-12, 2011

MONTEIRO BG, SERAFIM RC, MELO GB, SILVA MC, LIZIER NF, MARANDUBA CM, SMITH RL, KERKIS A, CERRUTI H, GOMES JA, KERKIS I. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 42, n. 5, p. 587-94, 2009.

MUENCH MO, BARCENA A. Stem cell transplantation in the fetus. **Cancer Control**. Mar-Apr; v.11, n. 2, p.105-18, 2004. Review.

MUOTRI A R, NAKASHIMA K, TONI N, SANDLER VM, GAGE FH Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. **PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences**, December 20, v. 102, n.51, p. 18644-48, 2005.

NIKOLOVA, G; STRILIC B; LAMMERT, E. The vascular niche and its basement membrane. **Trends Cell Biology**, v. 17, p. 19–25, 2007.

NAKAGE, A. P; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 325-329, 2006.

NOIA, G; PIERELLI, L; BONANNO, G; MONEGO, G; PERILLO A, RUTELLA S, CAVALIERE AF, DE SANTIS M, LIGATO MS, FORTUNATO G, SCAMBIA G, TERZANO GM, IANNACE E, ZELANO G, MICHETTI F, LEONE G, MANCUSO S. A novel route of transplantation of human cord blood stem cells in preimmune fetal sheep: The intracelomic cavity. **Stem Cells**, v. 21, p. 638-646, 2003.

OPPENHEIM SM, MUENCH MO, GUTIÉRREZ-ADÁN A, MOYER AL, BONDURANT RH, ROWE JD, ANDERSON GB. Hematopoietic stem cell transplantation in utero produces sheep-goat chimeras. **Blood Cells Molecules & Disease**, Jan-Feb, v. 27, n. 1, p. 296-308, 2001.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p.701-5, 2001.

PALERMO AT, LAMBARGE MA, DOYONNAS R, POMERANTZ J, BLAU HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. **Development Biology**, v. 279, p. 336-44, 2005.

PENFORNIS P, POCHAMPALLY R. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. **Methods Molecular Biology**, v. 698, p.11-21, 2011.

PERANTEAU W H; TODD E H; GU Y C; VOLK S W; BAUER T; ALCORN K, TUSCHONG L M, JOHNSON M P, HICKSTEIN D D, FLAKE A Haploidentical In Utero Hematopoietic Cell Transplantation Improves Phenotype and Can Induce Tolerance for Postnatal Same-Donor Transplants in the Canine Leukocyte Adhesion Deficiency Model. **Biology of Blood Marrow Transplantation**, v. 15, p.293-305, 2009.

PRETZER S.D. Canine embryonic and fetal development: A review **Theriogenology**, n. 70, p. 300–303, 2008

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p.143-7, 1999.

PORADA, C.D.; PARK, P.; ALMEIDA-PORADA, G.; ZANJANI, E.D. The sheep model of in utero gene therapy. **Fetal Diagnosis Theratology**, v. 19, n. 1, pp. 23-30, 2004.

POUNTOS I, GIANNOUDIS PV. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury, Int J Care Injured**, v. 36, p. S8-S12, 2005.

ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN. Searching for alternative sources as postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from Umbilical cord. **Stem Cells**, v. 21, p.105-10, 2003.

SANTOLAYA-FORGAS J, GALAN I, DELEON-LUIS J, WOLF R. A Study to Determine if Human Umbilical Cord Hematopoietic Stem Cells Can Survive in Baboon Extra-Embryonic Celomic Fluid: A Prerequisite for Determining the Feasibility of in-utero Stem Cell Xeno-Transplantation via Celocentesis. **Fetal Diagnosis Theratology**, v.22, p.131-135, 2007.

SANTORE MT, ROYBAL JL, FLAKE AW. Prenatal Stem Cell Transplantation and Gene Therapy. **Clinical Perinatology**, v.36, p.451–471, 2009.

SCHIERHOLT A.S., FONSECA I., SILVA P.V., PAIVA S.R., CHAVES L.C.S., LOPES P.S., FARIA D.A., GUIMARÃES S.E.F. Análise filogenética do gene da miogenina **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.156-162, 2008.

SCHOEBERLEIN A; HOLZGREVE W; DUDLER L; HAHN S; SURBEK DV. Tissue-specific engraftment after in utero transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into sheep fetuses. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.192, p. 1044-52, 2005.

SELL S. Stem cells - What are they Where they come from. **Stem Cell Handbook** ed. by Sell Stewart, Human Press Totawa, New Jersey Cap. 1, p. 1-18, 2004.

SHAKE JG, GRUBER PJ, BRAUMGARTNER WA, SENECHAL G, MEYERS J, REDMOND JM, PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **Ann Thorac Surg**, v. 73, p.1919-25, 2002.

SHAW SWS; DAVID AL; DE COPPI P Clinical applications of prenatal and postnatal therapy using stem cells retrieved from amniotic fluid **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, April 23,n. 2, p.109–116, 2011

SHIKANAI M, ASAHINA K, ISEKI S, TERAMOTO K, NISHIDA T, SHIMIZU-SAITO K, OTA M, ETO K, TERAOKA H. A novel method of mouse ex utero transplantation of hepatic progenitor cells into the fetal liver. **Biochem Biophys Res Commun**. Apr 3, v.381, n. 2, p. 276-82, 2009

SORRELL JM, CAPLAN AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Res Ther**, v.1, p.30, 2010.

SOUSA A. R, AMORIM M. R. Avaliação da vitalidade fetal intraparto. **Acta Medica Portuguesa**, v. 21, n. 3, p.229-240, 2008.

TAYLOR PA, MCELMURRY RT, LEES CJ, HARRISON DE, BLAZAR BR. Allogenic fetal liver cells have a distinct competitive engraftment advantage over adult bone marrow cells when infused into fetal as compared with adult severe combined immunodeficient recipients. **Blood**. Mar 1, v.99, n.5, p. 1870-2, 2002.

TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSEN BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**. Apr 4, v.416, n. 6880, p. 542-5, 2002.

THOMSON JA, ITSOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, p.1145-1147, 1998.

PHINNEY DG, PROCKOP DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—Current Views. **Stem Cells**, v. 25, p.2896–902, 2007.

TOURAINÉ JL. Stem cell transplantation in primary immunodeficiency, with special reference to the first prenatal, in utero, transplants. **Allergol Immunopathol (Madr)**. Mar-Apr, v. 19, n.2, p.49-51, 1996.

TROEGER, C.; PERAHUD, I.; MOSER, S.; HOLZGREVE, W. Transplacental traffic after in utero mesenchymal stem cell transplantation. **Stem Cells and Development** Sep; v.19,n. 9, p.1385-92, 2010.

VAAGS AK, GARTLEY CJ, HALLING KB, DOBSON H, ZHENG Y, FOLTZ WD, DICK AJ, KRUTH SA, HOUGH MR. Migration of cells from the yolk sac to hematopoietic tissues after in utero transplantation of early and mid gestation canine fetuses. **Transplantation**. April, v. 91, n.7, p.723-30, 2011.

WANG L, LI Y, CHEN X, CHEN J, GAUTAM SC, XU Y, CHOPP M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. **Hematology**, v.7, p.113-17, 2002.

WENGLER GS, LANFRANCHI A, FRUSCA T. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDXI). **Lancet**, v. 348, p. 1484-1487, 1996.

WENGLER GS, LANFRANCHI A, FRUSCA T. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDXI). **Lancet**, v. 348, p. 1484-1487, 1996.

WEISSMAN IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. **Science**, v. 287, p.1442-1446, 2000.

WESTGREN M, RINGDEN O, EIK-NES S. Lack of evidence of permanent engraftment after in utero fetal stem cell transplantation in congenital hemoglobinopathies. **Transplantation**, v. 61, p. 1176-1179, 1996.

WESTGREN M. In utero stem cell transplantation. **Seminars Reproductive Medicine**. Nov; v. 24, n. 5, p.348-57, 2006.

YAMAZAKI K, ALLEN TD. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex" **American Journal of Anatomy**, v.187, p. 261-76, 1990.

YEAGER AM; CONCANNON PW. **Small Animal Ultrasound**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven,. 233 pp, 1996.

YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**. Apr 4, v. 416, n. 6880, p.545-8, 2002.

ZANJANI ED. [The human/sheep xenograft model for assay of human HSC](#). **Stem Cells**,;15 Suppl v.1, p. 209, 1997.

APÊNDICES

Figura 8- Feto canino A- Membranas fetais (a) Saco vitelino, (b) Membrana Alantóide; (c) Membrana Amniótica; B- Feto canino após a retirada da membrana Alantóide permitindo o desdobramento da placenta zoonária, (d) cinta placentária, (e) hematoma marginal, observe em (f) o local para a IP (injeção intra-peritoneal); C- no detalhe (f') demonstramos ausência de lesão no local, (g) cicatriz e vasos umbilicais

Figura 9- Útero canino gravídico, exposto após Laparotomia exploratória. Nesta figura estamos demonstrando os Cornos Uterinos: Direito (CUd) e Esquerdo (CUe) do modelo experimental, bem como o Mesométrio. Os números indicam os fetos A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7

Fig. 10 – **A idade gestacional e viabilidade fetal.** (A) Diâmetro transversal do tórax (DTT) - 2,02 e em (B) o Diâmetro do abdome (DA) – 2,39 ao nível do estômago. Vemos uma estrela ✦ em (A) indicando o coração com suas câmaras evidentes neste período fetal (+- 43 dias); um triângulo ▲ (pulmão) e um círculo ● (fígado) indicando suas diferentes ecogenicidades

Figura 11 – **A idade gestacional e viabilidade fetal.** (A) As setas brancas demonstram as medidas de CR (comprimento do corpo - Crow-Rump) e CP (comprimento da placenta); (B) apresentamos a medida de EP (placenta zonária), AL (alantóide), AM (âmnio)

Figura 12 – **Momento do transplante intra uterino e avaliação do bem estar fetal.** (A e B) Demonstramos a aferição da FCF durante o acesso da via intraperitoneal do feto A1. Em C e D, o momento do acesso a cavidade intraperitoneal, nota-se na seta amarela a imagem do cateter penetrando a musculatura do abdome, e na seta preta o cateter intra abdominal

Figura 13 – **Momento do transplante intra uterino.** Presença de líquido livre (LL) na cavidade intraperitoneal após o TIU-CTIPD. Em A (LL) região diafragmática; em B (LL) entre alças intestinais

Figura 14 - **Estômago**. A) Setas brancas indicam a região das glândulas, onde estão localizadas as células parietais e mucosas. B) Setas amarelas indicam lamina própria constituída pelo tecido conjuntivo frouxo, entremeado por fibras musculares lisas. C-C1) CTIPD-*GFP* (verde) são encontradas nas glândulas gástricas dentro dos nichos de células-tronco intrínsecas glandulares (setas brancas). D-D1) CTIPD-*GFP* localizadas na musculatura lisa adquirindo a morfologia das células do tecido receptor (setas amarelas). Algumas CTIPD-*GFP* não demonstram fusão celular e foram encontradas individualizadas. A,B = coloração HE, microscopia de luz (ML), C-D1 fluorescência direta, núcleos corados em PI (vermelho). C,D = confocal microscopia de fluorescência (Fcm) + contraste de interferência diferencial (CID). Barras de escala: A = 200 μ m, B= 100 μ m, C-D1=20 μ m

Figura 15- **Intestino** A, B- Morfologia, setas brancas indicam a região glândular. C-D) CTIPD-*GFP* são encontradas nas glândulas gástricas dentro dos nichos de células-tronco intrínsecas glandulares (setas brancas). A,B = coloração HE, ML, C-D = fluorescência direta, núcleos corados em PI (vermelho). C,D = Fcm+ CID. Barras de escala: A = 100 μ m, B= 50 μ m, C-D=20 μ m

Figura 16- **Fígado** – A, B) Morfologia, as setas brancas indicam uma célula binucleada com o citoplasma comum (seta branca), A seta amarela indica uma células uninucleada. C-D) CTIPD-GFP (verde) binucleada seta branca, uninucleada seta amarela. A,B = coloração HE, ML, C-D = fluorescência direta, núcleos coradas em DAPI (azul). C,D = Fcm+ CID. Barras de escala: A = 100 μ m, B= 40 μ m, C-D=20 μ m

Figura 17- **Fígado**. A-D) Enxertia das CTIPD-GFP (marrom) observadas no feto canino pela imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos. A,B) As células binucleadas que reagem positivamente com anti-GFP demonstrando a localização citoplasmática. Sugere-se a fusão entre as células humanas (setas amarelas) e caninas (setas brancas). C,D) CTIPD-GFP (anti-HuNu) apresentam localização perivascular no endotélio dos vasos (setas amarelas) no local dos pericitos, os núcleos (em azul) do tecido recipiente apresentam morfologia célula endotelial, alongada (azul). As lâminas são contra-coradas com eosina, ML. Barras de escala: A = 20 μ m, B,D=5, C= 10 μ m

Figura 18- **Fígado.** A enxertia das CTIPD-*GFP* observadas no feto canino utilizando a técnica FISH com sondas específicas de DNA para seguintes cromossomos autossômicos (CrA) 13 e 18 marcados com fluorocromos verde e vermelho, respectivamente: A-C) Seta brancas indicam várias células com os cromossomos marcados. Inserção em (A) demonstra somente um par dos cromossomos 13+18. B-C) Demonstram dois pares dos cromossomos autossômicos (setas vermelho e verde, brancas em C). Núcleos corados em DAPI. Anel em (B) demonstra vários cromossomos autossômicos humanos, porém os núcleos encontram-se fora de foco. A=Fcm+ CID, B,C= Fm+Fcm, Barras de escala: A = 10 μ m, B,C=5 μ m

Figura 19- **Fígado.** A,B) A enxertia densa das CTIPD-*GFP* (verde, setas branco) no fígado fetal canino. C) A enxertia das CTIPDs confirmada pela a técnica FISH utilizando sonda de DNA autossômica para o cromossomo 13 (verde e setas verdes). Em (D) Maior aumento para mostrar detalhe da figura anterior. A,B=Fcm+Fm+ CID, B,C= Fm+Fcm, Barras de escala: A,B= 20 μ m, C,D=5 μ m

Figura 20 I- **Pulmão** - A enxertia das CTIPD-GFP no parênquima pulmonar e na região dos septos interalveolares. A) Morfologia do tecido pulmonar -. B) Anticorpo anti-GFP (rodamina, vermelho) marcação positiva das CTIPD-FP no endotélio

Figura 20 II- **Pulmão**- C)- Anticorpo anti-GFP (anticorpo secundário, FITC-verde) marcação positiva das CTIPD-GFP fibroblasto-símile no estroma pulmonar de tecido conjuntivo. D) CTIPD-GFP nos sacos alveolares. E) Morfologia dos sacos alveolares do pulmão. F) A enxertia das CTIPD confirmada pela a técnica de FISH, sondas de DNA para dois autossomos (seta vermelha), observa-se quatro sinais conformando o estado diplóide de célula. Núcleos corados com DAPI (azul) ou PI (vermelho). A,E=ML, B,F=Fcm+Fm, C,D= Fcm, Barras de escala: A = aumento 200x, B-E = 20 μ m, F=10 μ m

Figura 21- **Coração.** Enxertia das CTIPD-*GFP* (marrom) observada no miocárdio canino pela imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos. A) Morfologia do tecido cardíaco fetal canino, B,D) CTIPD-*GFP* reagem positivamente com o anticorpo anti-*GFP* demonstrando a localização citoplasmática. Sugere-se a fusão entre as células humanas e de cão. C e D) mesmo que em B utilizando anti-CTIPD e anti-HuNu anticorpos, respectivamente. Em D) as CTIPD (setas brancas) apresentam localização perivascular no endotélio achatado dos vasos, os núcleos em azul do tecido recipiente (seta preta). F) Controle o anti-corpo primário anti-CTIPD foi omitido. As lâminas são contra-corados com eosina, ML. Barras de escala: A = 200 μ m, B,C=50 μ m, D= 10 μ m, F=100 μ m

Figura 22- **Miocárdio.** A) Morfologia. B e C) Marcação positiva para anti-HuNu (setas brancas) observada em músculo liso (B) e em cardiomiócitos (C), demonstrando o tecido quimérico humano-cachorro(seta preta). D) Controle (anti-corpo primário foi omitido). A-D=LM, Barras de escala: A,F = 50 μ m, B =100 μ m, C= 20 μ m

Figura 23- **Tecido Muscular Estriado Esquelético** (A) Morfologia. B, B1) Contribuição das CTIPD-*GFP* na fibra muscular (verde) , setas branca. C, C1) Tecido conjuntivo circulante, anel braço. D) Confirmação de formação dos tecidos quiméricos humanos-cão utilizando anti-GFP anticorpo, anel branco. Núcleos corados em PI (vermelho). A,D=ML, B,C=Fcm+CID, B1,C1=Fcm. Barras de escala: A = 200 μ m, B-C1= 20 μ m, D=10 μ m

Figura 24- **Baço**. Enxertia das CTIPD em baço fetal do cão. A,B) Morfologia do tecido de baço. C,D) A enxertia das CTIPD-*GFP* observada preferencialmente no estroma da polpa vermelha. Núcleos corados em PI (vermelho). A,B=ML, C=Fcm+CID, C= Fcm. Barras de escala: A,B = 100 μ m, C,D= 20 μ m

Figure 25- **Baço.** Enxertia densa das CTIPD-GFP em baço fetal do cão. A,B) Morfologia do tecido de baço. C,D) A enxertia das CTIPD-GFP observada preferencialmente no estroma da polpa vermelha. Núcleos corados em PI (vermelho). A =ML, B1, B3=Fcm, B2=CID, B4=Fcm+CID. Barras de escala: A = 50 μ m, B1-B4= 50 μ m

Figure 26- **Baço.** A enxertia das CTIPD-GFP observada pela imunohistoquímica. A,B) anti-CTIPD e anti-HuNu anticorpos (setas brancas), C) controle, D,E) anti-HuNu (anel branco) e anti-GFP (anel preto) antibodies (marrom). Núcleos contra corados com Eosina. A-E=ML, Barras de escala: A,B = 10 μ m, C,D= 20 μ m, E= 50 μ m

Figure 27- **Rim.** A enxertia das CTIPD-GFP nos rins fetais de cão. A,B – Morfologia dos rins fetais de cão. C) A enxertia das CTIPD-GFP utilizando anticorpo anti-GFP e rodamina (vermelho). D) Mesmo que em C, utilizando a fluorescência direta CTIPD-GFP (verde). Núcleos corados em DAPI (azul). A,B=ML, C,D=Epi-fluorescência (Fm). Barras de escala: A,B,D = 50 μ m, C = 20 μ m

Figure 28- **Rim.** A enxertia das CTIPD-GFP observada pela imunohistoquímica. A) anti-GFP, B) anti-HuNu e C) anti-CTIPD anticorpos (anéis pretas), D) controle. Núcleos contra corados com Eosina. A-D=ML. Barras de escala: A-C = 20 μ m, D=30 μ m

Figura 29- **Cérebro**. A análise histológica e de fluorescência direta da enxertia das CTIPD-*GFP*+ no cérebro. A) Morfologia do tecido cerebral do feto canino. B-B1) As CTIPD-*GFP*+ foram encontradas na camada molecular da substância branca. As CTIPD apresentaram a morfologia semelhante aos fibroblastos e formaram clusters. A=ML. B1=Fcm, B2-D=Fcm+CID. Barras de escala: A=50µm, B1-D = 20µm. Núcleos corados com PI

Figura 30- **Cérebro**. (A) Morfologia do tecido cerebral do feto canino, demonstrando a enxertia das CTIPD-*GFP*+ nos vasos sanguíneos em (B) Fluorescência direta (C), Imunofluorescência indireta utilizando anticorpo anti-GFP (rodamina, vermelho) e (D)- Imunohistoquímica demonstrando a marcação positiva contra anticorpo anti-HuNu (marrom). Núcleos corados com PI e DAPI, respectivamente. A,D=LM, B=Fcm, C=Fcm+Fm. Barras de escala: A,D= 50 µm, B,C = 20µm

Figura 31- **Cérebro**. A) Morfologia do tecido fetal cerebral de cão. Em (B) CTIPD-*GFP*⁺ apresentam a morfologia fibroblasto-símile. Em (C) marcação positiva para anticorpo anti-HuNu, em (C) aumento maior. A-D=50µm,LM, A= B,D=5µm, C = 20µm

Figura 32- **Cerebelo**- A-A3) Córtex cerebelar de cão as CTIPD-*GFP*⁺ com morfologia semelhante as células de Purkinje com os prolongamentos axônais. A4) Aumento maior de (A-A3). Núcleos corados em PI. A,A1,A4 = Fcm, A2=CID, A3= Fcm+CID. Barras de escala: A-A4 = 20µm

Figura 33- **Placenta**. A) Morfologia do tecido extraembrionário de cão. B1, B2) As CTIPD demonstraram a localização nos tecidos extra-embrionário de cão no endotélio da artéria e na camada muscular, assim como na região perivascular de uma veia da placenta (C). A=LM, B1,C=Fcm+CID, B2=Fcm, Núcleos corados em PI. Barras de escala: A=50µm, B1-C = 20µm

Figura 34- **Placenta**. A) Controle, o anti-corpo primário foi omitido. Em (B-D) marcação positiva das CTIPD-GFP+ para anticorpo anti-HuNu (anel preto) núcleos de cão negativos para anti-HuNu (anel branco), localização na região das CTM de vilosidade. A-D= LM. A-D=50µm

Figura 35- **Placenta**. Análise da enxertia de CTIPD-GFP+ por imunofluorescência (A) Morfologia do tecido placentário. B) Células binucleadas de CTIPD-GFP+ (rodamina, vermelho) dentro do vilo fetal, seta branca indica e célula de cão somente com o núcleo marcado. C) Localização intra-placentária e intra-endotelial de CTIPD-GFP+ (vermelho). D) CTIPD-GFP+ localização na região das CTM de vilosidade. A=ML, B,D=Fm, C=Fcm+Fm+CID. Núcleos corados em DAPI. Barras de escala: A=50µm, B-D = 5µm

Figura 36- **Placenta**. (A) Morfologia do tecido da placenta. B-D) CTIPD-GFP+ (rodamina, vermelho) localização intra-placentária. Em (B) CTIPD-GFP+ com o núcleo deslocado migrando. A=ML, B-C=Fcm+Fm+CID. Núcleos corados em DAPI. Barras de escala: A=50µm, B-D = 5µm

Figura 37- **Análise dos tecidos derivados do endoderma - Tecido Pulmonar.** Quantificação dos dados da enxertia das CTIPDs e do seu ciclo celular e da sua proliferação após transplante realizada por Citometria de fluxo A,B) Quantificação da enxertia das CTIPDs em um fragmento do tecido pulmonar, marcação positiva para os anti-corpos A) anti-CTIPD (52,8%) e B) anti-HuNu (50,2%). C,D) Apresentação gráfica das fases de ciclo celular das CTIPDs. D) Gráfico da análise quantitativa e comparativa das CTIPDs nas diferentes fases do ciclo celular

Figura 38-. **Análise dos tecidos derivados do mesoderma – Tecido muscular esquelético estriado – Bíceps Femoral** . Quantificação dos dados da enxertia das CTIPDs e do seu ciclo celular e da sua proliferação após transplante realizada por Citometria de fluxo A,B) Quantificação da enxertia das CTIPDs em um fragmento do Tecido Muscular Estriado Esquelético (Bíceps femural) com marcação positiva para os anti-corpos A) anti-CTIPD (52,8%) e B) anti-HuNu (50,2%). C,D) Apresentação gráfica das fases de ciclo celular das CTIPDs. D) Gráfico da análise quantitativa e comparativa das CTIPDs nas diferentes fases do ciclo celular

A

B

C

D

Figura 39- **Análise dos tecidos derivados do mesoderma - Tecido Renal** . Quantificação dos dados da enxertia das CTIPDs e do seu ciclo celular e da sua proliferação após transplante realizada por Citometria de fluxo. A,B) Quantificação da enxertia das CTIPDs em um fragmento do tecido renal, marcação positiva para os anti-corpos A) anti-CTIPD (42,3%) e B) anti-HuNu (31,3%). C,D) Apresentação gráfica das fases de ciclo celular das CTIPDs. D) Gráfico da análise quantitativa e comparativa das CTIPDs nas diferentes fases do ciclo celular

Figura 40 - **Análise dos tecidos derivados do ectoderma – Cérebro e Cerebelo.** Quantificação dos dados da enxertia das CTIPDs e do seu ciclo celular e da sua proliferação após transplante realizada por Citometria de fluxo. A,B) Quantificação da enxertia das CTIPDs em um fragmento do Tecido Cerebral, marcação positiva para os anti-corpos A) anti-CTIPD (13,1%) e B) anti-HuNu (13,4%). C, D) Apresentação gráfica das fases do ciclo celular das CTIPDs. D) Gráfico da análise quantitativa e comparativa das CTIPDs nas diferentes fases do ciclo celular

Figura 41- **Análise dos tecidos extra-embrionários – Placenta Materna e Hematoma placentário.**

Quantificação dos dados da enxertia das CTIPDs e do seu ciclo celular e da sua proliferação após transplante realizada por Citometria de fluxo. A,B) Quantificação da enxertia das CTIPDs em um fragmento do tecido placentário materno, marcação positiva para os anti-corpos A) anti-CTIPD (67%) e B) anti-HuNu; Apresentação gráfica das fases do ciclo celular das CTIPDs em C) placenta materna e em D) hematoma placentário; E,F) Gráfico da análise quantitativa e comparativa das CTIPDs nas diferentes fases do ciclo celular

Figura 42- **Miocárdio**. Expressão de proteína humana anti-OCT3/4 (vermelho) nas células CTIPD-GFP+ (verde) enxertadas entre as fibras musculares do Miocárdio de feto canino (A1-A3). A1- Sobreposição entre OCT3/4 CTIPD-GFP+ e CID observa-se localização citoplasmática e nuclear A2) Expressão de de proteína verde na citoplasma das CTIPD. A3) Marcação positiva para Oct 3/4. Localização “mio-cito-like”. A1-A2=Fcm. A3-Fcm+CID. Barra de escala: A1-A3=5µm

Figura 43- **Tecido Cardíaco. Citometria de Fluxo**. Expressão dos marcadores de células não diferenciadas (CTM e CET) nas CTIPD-GFP+ no Miocárdio. A) Controle do volume celular. B-D) Expressão das proteínas (B) OCT3/4 (C) CD146 e (D) β -integrina; nas CTIPD.GFP+

Figura 44- **Tecido muscular estriado esquelético – Bíceps Femoral. Citometria de Fluxo.** Expressão dos marcadores de células não diferenciadas (CTM e CET) nas CTIPD-GFP+ no tecido muscular estriado esquelético - Bíceps. A) Expressão das proteínas OCT3/4 com 45,4% (B) CD146 com 0,4% e em (C) β -integrina com 36,7%; nas CTIPD.GFP+.

Figura 45- **Tecido cardíaco . Citometria de Fluxo.** Expressão dos marcadores de células diferenciadas no tecido cardíaco. A expressão positiva para as proteínas cardíacas: miogenina (A), cardiotina (C) e negativa para CK-18 (B). Foi observada a expressão positiva para CD45+, que varia no Miocárdio (D) e no Arco Aórtico (E), apresentando diferentes frequências

Figura 46- **Tecido muscular estriado esquelético – Bíceps Femoral. Citometria de Fluxo.** Expressão dos marcadores de células diferenciadas no tecido muscular estriado esquelético – Biceps Femoral. A expressão positiva para as proteínas musculares: (A) Myo D1, (B) Miogenina com 7,5%, (C) CK-18 com 7,7% e em (D) CD45 com 12,0%.

A

B

C

D

Figura 47- **Placenta. Expressão de proteína humana OCT3/4 (vermelho) nas células CTIPD-GFP+ (verde) enxertadas no tecido placentário materno do feto canino (A1-A3).** A1) marcação positiva para Oct 3/4. A2) Fluorescência direta GFP observada nas CTIPDs, A3) Sobreposição entre Oct3/4, CTIPD-GFP e CID observa se localização citoplasmática e nuclear. A1=Fcm+CID; A2-A3=Fcm; Barras de escala: A1-A3=10µm

Figura 48- **Placenta - Citometria de Fluxo. Expressão dos marcadores de células não diferenciadas (CTM e CET) nas CTIPD-GFP+ no tecido placentário.** A) Controle do volume celular (B) Expressão das proteínas OCT3/4 com 12,6% (C) CD146 com 2,5% e em (D) β -integrina com 18,3%; nas CTIPD.GFP+

Figura 49 – **Placenta. Expressão dos marcadores de células diferenciadas (CTIPDh) - CD45 (9,4%) e CK18 (2,3%) no tecido placentário**

Figura 50 – **Coração - Citometria de Fluxo.** Expressão dos marcadores de células diferenciadas no tecido cardíaco. A expressão positiva para as proteínas cardíacas: miogenina (A), cardiotina (C) e negativa para CK-18 (B). Foi observada a expressão positiva para CD45+, que varia no tecido muscular (D) e vasos cardíacos (E), apresentando as frequências diferentes