BRUNA ANDRADE AGUIAR

**Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal
canino**

São Paulo
2016

BRUNA ANDRADE AGUIAR

Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3326
FMVZ

Aguiar, Bruna Andrade
Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino / Bruna
Andrade Aguiar. -- 2016.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Células beta-pancreáticas. 2. Diabetes mellitus. e. Cão. 4. Terapia celular.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino", protocolado sob o CEUA nº 4406140915, sob a responsabilidade de **Profª. Drª. Maria Angélica Miglino** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) na reunião de 23/03/2016.

We certify that the proposal "Obtention and characterization of derivated cells from canine fetal pancreas", utilizing 10 Dogs (10 males), 2 Transgenics mice (2 females), protocol number CEUA 4406140915, under the responsibility of **Profª. Drª. Maria Angélica Miglino** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMZV) in the meeting of 03/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **07/2016**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Procedência: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos**

idade: **50 a 60 dias**

N: **10**

Linhagem: **SRD**

Peso: **100 a 300 g**

Procedência: **Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ USP**

Espécie: **Camundongos transgênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 2 meses**

N: **2**

Linhagem: **Balb-cnu/nu**

Peso: **20 a 25 g**

Resumo: A ocorrência de Diabetes mellitus em cães é cada vez maior, sendo um distúrbio endócrino que, assim como em humanos, devido a uma falha no controle adequado de glicose no sangue, desencadeia a hiperglicemia, glicosúria e perda de peso. A necessidade de informações e novas alternativas de tratamento para Diabetes mellitus nesta espécie se faz imprescindível, visto que muitos proprietários se deparam com o diagnóstico, sem ter o conhecimento sobre monitoramento e tratamentos da doença, além dos gastos que decorrem da situação. Novas abordagens para o tratamento de cães têm sido testadas, selecionando-se as melhores alternativas de terapia celular buscando condições que facilitem e garantam qualidade de vida para esta espécie. No entanto, apesar dos estudos utilizando o cão como modelo experimental, a literatura científica é limitada em trabalhos que estabeleçam um protocolo de obtenção de células produtoras de insulina in vitro a partir de precursores de células beta-pancreáticas em feto canino, destacando a importância do presente estudo, inovando em possíveis caminhos para terapia celular.

Local do experimento: Biotério do Núcleo de Terapia Celular e Molecular

São Paulo, 06 de abril de 2016

Profª. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

São Paulo, 06 de abril de 2016
CEUA N 4406140915

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Profª. Drª. Maria Angélica Miglino

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Maria Angelica Miglino (orientador)

Título do projeto: "Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 29/março/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Foi realizada mudança do título do projeto de pesquisa devido às dificuldades encontradas na execução dos protocolos e técnicas que antes dariam ênfase ao título proposto (Obtenção de células produtoras de insulina in vitro a partir de pâncreas fetal canino), e então foi proposto um novo título para que o projeto ficasse adequadamente coerente: "Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino". Título em inglês: "Obtention and characterization of derivated cells from canine fetal pancreas". O projeto atualizado encontra-se anexado na Emenda."

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

São Paulo, 14 de abril de 2016

CEUA N 4406140915

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Profª. Drª. Maria Angélica Miglino

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Maria Angelica Miglino (orientador)

Título do projeto: "Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 29/março/2016) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Mudança do título □ Devido às dificuldades de protocolos e técnicas que antes dariam ênfase ao título proposto (produção de insulina in vitro), foi decidido alterá-lo para que o projeto ficasse adequadamente coerente. Antigo: □ Obtenção de células produtoras de insulina in vitro a partir de pâncreas fetal canino □ Novo título: □ Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino □. Novo título em inglês: □ Obtention and characterization of derivated cells from canine fetal pancreas □. 2. Acréscimo de novas técnicas na metodologia do Projeto: Para melhor caracterização das células quanto sua função e origem, foi decidido retirar a técnica de Citometria de Fluxo, e incluir técnicas que esclarecessem dúvidas recorrentes e melhor caracterizassem as células nessa fase do desenvolvimento como a Coloração com Ditzona, a Histologia do tecido pancreático de feto canino e a Imunohistoquímica por Imunofluorescência. Antes: □ Animais □ Obtenção das amostras e cultivo □ Citometria de fluxo □ Análise morfológica □ Avaliação da atividade metabólica pelo método MTT □ Imunocitoquímica □ Análise do potencial tumorigênico Nova metodologia: □ Animais □ Obtenção das amostras e cultivo celular □ Análise morfológica □ Avaliação da atividade metabólica pelo método colorimétrico MTT □ Imunocitoquímica □ Coloração com Ditzona □ Histologia do tecido pancreático □ Imunohistoquímica □ Análise do potencial tumorigênico. "

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AGUIAR, Bruna Andrade

Título: **Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adson e Cláudia, que desde sempre me ensinaram que conhecimento é tudo, sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser fiel e não desamparar seus filhos.

Agradeço aos meus pais Adson e Cláudia Aguiar, por todo amor, dedicação, esforço e apoio em todos os momentos da minha vida, principalmente por estarem mesmo de longe, fazendo o impossível para que eu alcance meus objetivos, e também à minha irmã Nathália Aguiar, por toda parceria, sempre me alegrando e dando forças pra continuar. A vocês, minha base, meu muito obrigado por tudo!

Agradeço ao André Koga, meu noivo, pelo seu apoio, paciência, compreensão, parceria, refúgio e amor em todas as fases da nossa vida juntos, especialmente para esta conquista todo seu apoio foi fundamental, muito obrigada meu amor! Também à sua família que me acolheu e se tornou minha família, em nome de todos ao Srs. Paulo e Rosa Koga, agradeço.

Ao meu tio Antenor Santos, agradeço especialmente por me apresentar o mundo da pesquisa científica, suas instruções, conselhos e ensinamentos foram imprescindíveis para que tomasse o meu rumo à ciência, muito obrigada!

Agradeço a todos meus familiares, especialmente minhas avós Ady Rocha e Matildes Aguiar, todos os tios tias e primos que sabem que estiveram ao meu lado mesmo distante.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Maria Angelica Miglino, pela oportunidade, por me receber, abrir as portas para que eu pudesse aprender e proporcionou todos os meios para meu crescimento profissional, científico e pessoal, muito obrigada por tudo.

Agradeço a Dra. Paula Fratini que desde o começo se mostrou disposta a me auxiliar, em todas as dificuldades buscou comigo soluções e alternativas para que tudo desse certo, sempre com muita paciência me ensinou técnicas e acompanhou de perto todo o desenrolar do trabalho além de ser uma boa amiga, obrigada Fratina!!

Agradeço a Dra. Ana Cláudia Oliveria por toda ajuda e disposição no desenvolvimento do trabalho, colaborando diretamente, corrigindo e mostrando o melhor caminho a seguir, por tudo obrigada!

À professora Dra. Patricia Castelucci, agradeço especialmente pela colaboração, por todos os ensinamentos, por ceder espaço a mim no seu

laboratório, permitindo que eu aprendesse, acompanhando diretamente a produção dos resultados, por toda atenção e oportunidade muito obrigada!

À minha amiga Dailiany Orechio faltam palavras pra agradecer toda a parceria em todos esses anos de amizade, especialmente nessa pós-graduação foi imprescindível ter uma você por perto, desde o manejo dos ratos às idas ao Embu buscar material, sempre desanimando e animando juntas, obrigada por termos muita história pra contar minha amiguinha!

Agradeço à minha amiga de longa data, Samila Barbosa, pela amizade em todos os momentos, agradeço por ser a irmã mais velha sempre ao meu lado!

À amiga e colega Dayane Alcântara agradeço por me ajudar muito no começo desse projeto, dedicando tempo, atenção e muita paciência em todos os momentos ensinando o que podia sempre disposta, muito obrigada, suas informações abriram as portas para que tudo começasse e terminasse bem!

Aos colegas de pós-graduação que direta ou indiretamente estiveram ligados ao desenvolvimento do projeto, principalmente aliviando o fardo quando ficava difícil demais, Carla Maria Miranda, Luciano Leonel, Adriana Anunciação, Patrícia Romagnolli, Amilton Santos, Franceliusa Delys, Paulo Ramos, Ana Carolina Martins, Lara Carolina Mario, Jéssica Borghesi, Kátia Guimarães, João Leonardo, Rodrigo Barreto, Phelipe Favaron, muito obrigada por todo apoio.

Ao coordenador e professor José Roberto Kfoury, aos técnicos e funcionários do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Rose Eli Ricci, Ronaldo Agostinho, Jaqueline Santana, Rosemary Freitas, Augusto Eulálio, Ana Paula da Silva, agradeço por estarem sempre dispostos a ajudarem quando foi preciso.

Ao NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) agradeço pela disponibilidade de colaboração especialmente quanto ao espaço no biotério para os animais, dentre todo apoio recebido.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) agradeço especialmente por poder realizar técnicas em colaboração, nos Laboratórios Neurogastroenterologia, Neuroanatomia Química e Multiusuário de Histologia, à professora Patricia Castelucci, o professor Jackson Bittencourt, aos colegas Cristina Eusébio, Giovani Baroni e aos técnicos envolvidos, muito obrigada.

Aos médicos veterinários responsáveis pelas campanhas de castração, de onde proviam os fetos caninos utilizados como modelo experimental, e toda sua

equipe, agradeço pela disposição e auxílio todos os dias que precisamos vocês colaboraram muito, ao Dr. Erik Neves, Gabrielle Rezende, e todos os auxiliares da campanha do Embu das Artes, ao Dr. Rafael Agopian que colaborou também muito obrigada a todos os envolvidos.

Aos funcionários e professores do Comitê de Ética da FMVZ-USP agradeço por sempre estarem dispostos a ajudarem resolver as pendências durante o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários da Biblioteca agradeço por toda ajuda sempre que foi necessário, se mostraram dispostos em ajudar.

Agradeço ao CNPq pela oportunidade de auxílio financeiro.

À todos os que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, muito obrigada!

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

AGUIAR, B. A. **Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino.** [Obtention and characterization of derivated cells from canine fetal pancreas]. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A Diabetes mellitus em cães é cada vez mais frequente, decorrente de fatores genéticos e/ou ambientais, como um distúrbio endócrino que, de forma semelhante à que ocorre em humanos, falha no controle adequado de glicose no sangue, desencadeia a hiperglicemia, glicosúria e perda de peso. A terapia celular utilizando as células beta-pancreáticas tem sido alvo de estudos, devido à grande demanda de novos casos de Diabetes mellitus e à falta de órgãos para transplantes em humanos e animais. Acredita-se que a ciência possa responder e inovar em tratamentos, encontrando a possível cura para esta doença complexa. Portanto, o objetivo deste estudo foi obter e caracterizar células derivadas do pâncreas fetal canino de animais com idades compreendidas entre 50 e 60 dias de gestação. As células pancreáticas de fetos caninos apresentam morfologia fibroblastóide e crescimento em monocamada em cultivo, apresentam células pluripotentes e proliferativas, não são tumorigênicas e apresentam expressão de PDX1, um fator de transcrição que tem papel importante na ativação do gene promotor da insulina. O pâncreas possui inervação simpática, observado por fibras nervosas TH⁺. Histologicamente, o pâncreas fetal canino apresenta ácinos num estágio de organização avançado, com parênquima semelhante ao encontrado no cão adulto. As ilhotas pancreáticas são distribuídas no tecido de maneira irregular, organizando-se em pequenos aglomerados de células por entre os ácinos, especialmente próximas aos vasos sanguíneos. A coloração com Ditizona permitiu inferir a presença de insulina no tecido pancreático, o que foi comprovado mediante técnica de imunofluorescência, além da presença de células que expressam o hormônio somatostatina. Os resultados desta investigação indicam que o pâncreas fetal canino demonstra características favoráveis para ser uma fonte viável de células para estudos aplicados à terapia celular em cães. Outras investigações referentes à comprovação da produção de insulina *in vitro* por essas células se fazem necessárias.

Palavras-chaves: Células beta-pancreáticas. Diabetes mellitus. Cão. Terapia celular.

ABSTRACT

AGUIAR, B. A. **Obtention and characterization of derivated cells from canine fetal pancreas.** [Obtenção e caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino]. 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diabetes mellitus in dogs is increasingly common, due to genetic and/or environmental factors such as an endocrine disorder, similarly to what occurs in humans, failure to adequately control blood glucose triggers hyperglycemia, glycosuria and weight loss. Cell therapy using the pancreatic beta cells has been the subject of studies, due to the great demand of new cases of diabetes mellitus and the lack of organs for transplants in humans and animals. It is believed that science can respond and innovate treatments, finding a possible cure for this disease complex. Therefore, the objective of this study was to obtain and characterize derived cells from canine fetal pancreas, of animals aged between 50 and 60 days of gestation. The pancreatic cells of canine fetuses exhibit fibroblastoid morphology and growth in monolayer culture, exhibit pluripotent and proliferative cells, are not tumorigenic and have PDX1 expression, a transcription factor that plays an important role in the activation of the insulin gene promoter. The pancreas has sympathetic innervation observed by TH⁺ nerve fibers. Histologically, the fetal pancreatic acini canine presents an advanced stage organization with similar parenchyma that found in adult dog. The pancreatic islets are distributed in the fabric unevenly, organizing themselves into small clusters of cells through the acini, especially close to the blood vessels. Staining with Dithizone allowed inferring the presence of insulin in the tissue, which was confirmed by immunofluorescence, in addition to cells that express somatostatin. The results of this investigation indicate that the canine fetal pancreas shows favorable characteristics to be a feasible source of cells for cell therapy applied to studies in dogs. Further investigation regarding the evidence of *in vitro* production of insulin by these cells are required.

Keywords: Pancreatic beta cells. Diabetes mellitus. Dog. Cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Obtenção das amostras	28
Figura 2 - Análise morfológica do cultivo celular	36
Figura 3 - Análise morfológica do cultivo celular por Microscopia Eletrônica de Varredura	37
Figura 4 - Caracterização celular por Imunocitoquímica.....	38
Figura 5 - Avaliação do Potencial Tumorigênico	41
Figura 6 - Coloração com Ditizona	42
Figura 7 - Histologia do tecido pancreático.....	44
Figura 8 - Pâncreas de feto canino com aproximadamente 57 dias de gestação marcado pela Insulina, PDX1, PCNA, Somatostatina e DAPI.....	45
Figura 9 - Pâncreas de feto canino com aproximadamente 57 dias de gestação marcado pela Somatostatina, TH, PDX1, PCNA, Nanog e DAPI.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise quantitativa das duplas marcações a Insulina com PDX1, Insulina com PCNA e Insulina com Somatostatina, em células do pâncreas fetal canino	46
Tabela 2 - Análise quantitativa das duplas marcações a Somatostatina com TH, PDX1 com PCNA e PDX1 com Nanog em células do pâncreas fetal canino	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos anticorpos primários para Imunocitoquímica	30
Quadro 2 - Descrição dos anticorpos secundários para Imunocitoquímica.....	30
Quadro 3 - Descrição dos anticorpos primários para Imunofluorescência	33
Quadro 4 - Descrição dos anticorpos secundários para Imunofluorescência.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAPI	2,6-diamino-2fenilindole dicloridrato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
M	Molar
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NUCEL	Núcleo de Terapia Celular e Molecular
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
PBS	Solução Salina Fosfatada
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PDX1	<i>Pancreatic and Duodenal Homeobox 1</i>
pH	Potencial de hidrogênio
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TH	Tirosina Hidroxilase
Zn	Zinco
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	ANIMAIS	27
3.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E CULTIVO CELULAR	27
3.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CULTIVO CELULAR	28
3.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	28
3.4	IMUNOCITOQUÍMICA	29
3.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	30
3.6	COLORAÇÃO COM REAGENTE DITIZONA	31
3.7	HISTOLOGIA DO TECIDO PANCREÁTICO	31
3.8	IMUNOHISTOQUÍMICA	32
3.8.1	Técnica de Fixação e Congelamento	32
3.8.2	Métodos de Dupla Marcação por Imunofluorescência	33
3.8.3	Análise Quantitativa de Colocalização Celular	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Análise Morfológica do Cultivo Celular	36
4.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura do Cultivo Celular	37
4.2	IMUNOCITOQUÍMICA	37
4.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO	39
4.4	COLORAÇÃO COM REAGENTE DITIZONA	41
4.5	HISTOLOGIA DO TECIDO PANCREÁTICO	41
4.6	IMUNOHISTOQUÍMICA	43
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O pâncreas é um órgão essencial responsável, principalmente, por estabilizar os níveis de glicose no sangue. Derivado de células endodérmicas, o órgão é formado a partir dos brotos pancreáticos dorsal e ventral na extremidade caudal do intestino anterior do embrião. Após a rotação do duodeno para a direita, o broto pancreático ventral posiciona-se dorsalmente, posterior ao broto dorsal e finalmente fundem-se em um único órgão (SLACK, 1995; MOORE; PERSAUD, 2007; HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

Localizado nos segmentos epigástrico e mesogástrico da cavidade abdominal, o pâncreas canino é formado por dois lobos: o direito, delgado, segue o mesoduodeno, enquanto o lobo esquerdo, mais espesso, estende-se sobre a superfície caudal do estômago em direção ao baço, possuindo forma em “V”, cujo vértice, chamado corpo do pâncreas, encontra-se disposto caudo-medial ao piloro. O órgão é uma glândula anexa ao sistema digestório de mista função endócrina (secreção de hormônios insulina e glucagon) e exócrina (secreção de sucos e enzimas digestivas) (KÖNIG; LIEBICH, 2007; RIJNBERK; KOOISTRA, 2010).

O parênquima pancreático deriva-se do endoderma (brotos pancreáticos), os quais dão origem a uma rede de túbulos (ductos primários). No início do período fetal, os ácinos começam a se desenvolver a partir de agregados celulares dispostos ao redor dos ductos, enquanto as células pluripotentes presentes nos ductos pancreáticos fetais, proliferam-se, invaginam-se, separam-se dos ductos, e vascularizam-se para formar as ilhotas individuais, no entanto, ocasionalmente é possível encontrar células endócrinas por entre os ácinos exócrinos o que parece ser efeito de regulação do PDX1 (GITTES, 2009). Em cães, as ilhotas pancreáticas têm distribuição periférica, possuindo uma vascularização densa e reticular, apresentando uma microarquitetura irregular quando em neonatos, e mais heterogênea em cães adultos (HAWKINS et al., 1987; REDECKER et al., 1992; MOORE; PERSAUD, 2011).

A composição principal das células endócrinas nas ilhotas pancreáticas de cães saudáveis é de aproximadamente 80% de células beta, 10% de células alfa, e 10% de células PP e somatostatina positivas (SHIELDS et al., 2015).

A expressão de PDX1 (Homeobox Pancreático e Duodenal 1) é primordial e é o mais específico marcador da endoderme do pâncreas em desenvolvimento. O PDX1 é um fator de transcrição que tem papel importante na ativação do gene promotor da insulina, no estabelecimento e regulação da diferenciação das células beta pancreáticas, além de exercer funções comuns a humanos e cães na maturação e diferenciação do pâncreas (HERRERA, 2000; KAHAN et al., 2003; TAKEMITSU et al., 2013).

A somatostatina é um hormônio produzido pelas células D presente nas ilhotas pancreáticas. Nos mamíferos, dois tipos de somatostatina são descobertos um dos quais é composto por 14 resíduos de aminoácidos e é idêntica à da somatostatina hipotalâmica no rato, enquanto a outra molécula de somatostatina tem 28 aminoácidos, e ambas as somatostatinas são referidas como inibindo a insulina, o glucagon e a secreção de polipéptidos pancreáticos num mecanismo parácrino (OHKURA; TSUKAMURA; MAEDA, 2000).

O desenvolvimento de órgãos endócrinos fetais em cães é modulado pelo metabolismo materno o qual é influenciado pela placenta como uma barreira endócrina ativa. No entanto acredita-se haver um caminho independente como fonte de glicose na vida fetal, já que a hiperglicemia no feto é essencial para se evitar má formação do sistema nervoso central (AKAZAWA; AKAZAWA, 2005). Embora a placenta endoteliocorial apresente uma conexão materno-fetal mais restrita, a direção do gradiente de fluxo mostrou-se ser materno-fetal, podendo haver uma produção de insulina pelas membranas fetais assim como em humanos (WEI et al., 2003; CHANG et al., 2007; THURÓCZY et al., 2012).

Sabe-se que o pâncreas possui inervação simpática e parassimpática, e a utilização da Tirosina Hidroxilase (TH) como o marcador para revelar os nervos simpáticos no pâncreas, permite também a detecção de células endócrinas TH positivas, que transportam a enzima da via biossintética da catecolamina, mas não pertencem ao sistema nervoso simpático (JUANG et al., 2014). Acredita-se que, essa via catecolaminérgica não neural, possa modular o precursor endócrino e a neogênese das células beta pancreática produtoras de insulina (VÁZQUEZ et al., 2014).

A insulina é o único hormônio capaz de diminuir a concentração de glicose no sangue, e é sintetizada em quantidades significantes apenas pelas células beta-pancreáticas, nas quais no retículo endoplasmático rugoso é sintetizada como pré-

pró-insulina e, em seguida, convertida em pró-insulina pela remoção de um fragmento de peptídeo. A insulina é processada a partir da remoção do peptídeo C, e posteriormente, ambos são preparados e armazenados em grânulos secretores e liberados pelo processo de exocitose (GOODGE; HUTTON, 2000).

A injeção intraperitoneal de doses elevadas de insulina no feto canino durante a gestação gerou uma alta demanda de glicose que passa da mãe para o feto, para compensar a hipoglicemia, porém, esse fato não influencia o glicogênio, tampouco o teor total de carboidratos do fígado ou do músculo, tornando o feto canino altamente resistente à insulina. No entanto, houve um aumento do nível de ácido láctico do sangue fetal algumas horas após a injeção de insulina, e cerca de 3/4 da glicose que passou da mãe para o feto, é devolvida para a mãe sob a forma de ácido láctico mostrando que as células fetais são capazes de converterem a glicose em ácido láctico sem oxidação adicional deste, por não possuírem oxigênio suficiente (SCHLOSSMANN, 1938).

Existem diferenças significantes nas sequências de pró-insulina entre as espécies, por exemplo, os roedores têm duas pró-insulinas com diferentes sequências de aminoácidos, enquanto a insulina canina possui apenas uma. A insulina canina é similar à suína, que difere da humana em apenas um resíduo de aminoácido, e difere da insulina felina em três resíduos de aminoácidos (RIJNBEEK; KOOISTRA, 2010; ASADI; BRUIN; KIEFFER, 2015).

É possível observar as células secretoras de insulina e glucagon em suínos aos 19 dias de gestação e, em bovinos, entre o 26º e 27º dias de gestação (HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Já em humanos, é possível observar a secreção do hormônio insulina no início do período fetal (10 semanas gestacionais); enquanto que em ratos, ao redor do 17º dia gestacional; em camundongo 16º dia gestacional e em coelhos 19º dia gestacional (ARVY, 1971; MOORE; PERSAUD, 2011).

Ilhotas pancreáticas de espécies animais tais como camundongo, cão, porco e humano são conhecidos por corarem em vermelho carmim com o reagente Ditizona (substância de ligação ao zinco, devido ao seu conteúdo de zinco ser mais elevado em comparação com outros tecidos), pois esta substância é necessária em células beta-pancreáticas para a produção de insulina, sendo muito utilizada na identificação das ilhotas pancreáticas (SHIROI et al., 2002).

Anormalidades pancreáticas em cães, incluindo redução do número e do tamanho das ilhotas pancreáticas, resultam em diminuição no número de células beta, vacuolização e degeneração destas, levando à insuficiência na produção de insulina, seguida por descontrole da concentração de glicose no sangue, caracterizando assim a doença conhecida como Diabetes mellitus (NELSON; REUSCH, 2014). A Diabetes mellitus tipo I é uma doença autoimune caracterizada pelo desenvolvimento de autoanticorpos e destruição de células beta-pancreáticas produtoras de insulina pela infiltração de células T, é um problema da saúde de homens, cães, gatos e outros animais (GILLESPIE, 2006).

A etiologia da Diabetes mellitus em cães é multifatorial. Fatores tais como a obesidade, a dieta, a exposição a produtos químicos tóxicos ou drogas que causam resistência à insulina, levam a destruição imunomediada das células das ilhotas pancreáticas. Embora fatores genéticos provavelmente influenciem a susceptibilidade à doença, genes específicos e padrões de herança ainda não foram identificados na maioria das raças caninas (GUPTILL; GLICKMAN; GLICKMAN, 2003; FELDMAN; NELSON, 2004).

A Diabetes mellitus canina compartilha características com o tipo I da doença em humanos, especialmente devido à necessidade de tratamento com insulina exógena. Sua frequência em cães é cada vez maior, com a presença de hiperglicemia, glicosúria e perda de peso dos animais. Ao contrário da Diabetes tipo I em humanos, que ocorre principalmente na adolescência e início da idade adulta, em cães a maioria dos casos ocorre na meia-idade e em animais mais velhos onde muitas vezes a doença já se encontra em estágio avançado, havendo pouquíssima produção de insulina, ou até mesmo a destruição completa das células beta-pancreáticas (FELDMAN; NELSON, 2004; PÖPPL; GONZÁLEZ, 2005; FARIA, 2007; CATCHPOLE et al., 2013; ADAMS; HOLDER; CATCHPOLE, 2014; NELSON; REUSCH, 2014).

A composição predominante de células beta nas ilhotas pancreáticas caninas, e sua ausência quase total em cães diabéticos idosos, implicam fortemente que a Diabetes canina é semelhante à Diabetes humana tipo I, pois em casos clínicos de animais não se observa a proliferação de linfócitos de infiltração, proliferação compensatória de células beta, e nenhuma evidência de pancreatite, permitindo assim uma associação da Diabetes canina à deficiência de células beta extrema tanto em casos de animais jovens ou de mais idade (SHIELDS et al., 2015).

Identificou-se uma prevalência de Diabetes de 0,34% para cães, em clínicas veterinárias de atenção primária na Inglaterra, sugerindo que a associação entre machos castrados, raças específicas, diagnóstico de pancreatite ou hiperadrenocorticismo e Diabetes mellitus, poderia ajudar os clínicos quando se considera a Diabetes como diagnóstico diferencial. Os cães mais velhos ou aqueles com pancreatite no diagnóstico de Diabetes mellitus podem ter um prognóstico menos favorável, enquanto cães diabéticos castrados pareceram ter um risco reduzido de morte (MATTIN et al., 2014).

Apesar de roedores serem muito usados e preferidos como modelos experimentais de Diabetes mellitus, o cão apresenta vantagens quando há necessidade de grandes ou frequentes quantidades de amostras de sangue e tecidos. Eles têm desempenhado um papel importante e histórico na pesquisa da Diabetes mellitus, pois foi nesta espécie que essa doença foi produzida pela primeira vez experimentalmente. O papel do pâncreas foi reconhecido por Von Mering e Minkowski (1889), e os efeitos de extratos pancreáticos contendo insulina foram demonstrados pela primeira vez por Banting e Best (1922) em cães. A seu turno, o cão sofre um grande número de doenças herdadas, que surgem naturalmente e mimetizam as observadas em humanos (ENGERMAN; KRAMER, 1982; HUANG; LU; HSU, 2003; CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

O cão também tem sido considerado modelo adequado para estratégias em transferência de genes. Devido à similaridade com os humanos em termos de estrutura lobular, vascularização e inervação pancreática, a espécie difere dos roedores, por ter demonstrado eficiência na transferência de genes *in vivo*, após injeção de adenovírus com gene Beta galactosidase em via com circulação grampeada. Isso sugere o uso desta técnica para possível indução da regeneração de células beta-pancreáticas, a partir de precursores de ilhotas em Diabetes mellitus (AYUSO et al., 2006).

A administração da insulina Detemir SC a cada 12 horas mostrou-se uma opção de tratamento potencial para cães diabéticos, com eficácia comparável com o relatado para a insulina glargina. No entanto, a hipoglicemia mostrou-se substancialmente mais frequente, sugerindo que a dosagem inicial deve ser muito menor do que para outros tipos de insulina (FRACASSI et al., 2015).

Novas abordagens para o tratamento da Diabetes em cães têm sido testadas, selecionando-se as melhores alternativas de terapia celular, buscando condições

que facilitem e garantam qualidade de vida para esta espécie (HUANG; LU; HSU, 2003; BLUWOL et al., 2007; NIESSEN et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2013; GONÇALVES; AMBRÓSIO; PIEDRAHITA, 2014; MARX; SILVEIRA; BEYER NARDI, 2015).

A terapia celular tem sido uma alternativa em tratamentos para Diabetes mellitus. Células derivadas do próprio pâncreas têm sido estudadas, devido a sua possível capacidade de autoproliferação, pois além da célula beta possuir a proteína ciclina D2 atuando no processo de replicação da população de células maduras, tem a responsabilidade de expansão da massa de células beta no período pós-natal. No entanto, acredita-se que a proliferação das células beta seja resultado da diferenciação de precursores multipotentes localizados no parênquima pancreático (DOR et al., 2004; GEORGIA; BHUSHAN, 2004; SEABERG et al., 2004; VOLTARELLI et al., 2009).

No âmbito da terapia celular, as células-tronco pluripotentes também têm sido foco de estudos, devido sua capacidade de auto-renovação por tempo indefinido, manutenção da sua capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares, podendo ser mantida indiferenciada em cultivo, e ainda assim manter a competência para produzir todas as células dentro de um feto. Além disso, expressam uma série de fatores de transcrição para manter o estado de pluripotência, como por exemplo, Oct4 e Nanog (KUIJK et al., 2011).

O transplante de ilhotas tem sido proposto para o tratamento da Diabetes mellitus em humanos. Estudos utilizando a Tirosina Hidroxilase (TH) como marcador simpático, demonstram que a inervação simpática peri-enxerto semelhante ao da inervação simpática peri-ilhotas pancreáticas e inervação simpática perivascular foram alcançados, assemelhando-se às ilhotas do pâncreas. Enquanto isso, em receptores diabéticos, uma densidade mais elevada do nervo simpático no enxerto foi encontrado em comparação com enxertos em receptores normoglicêmicos, indicando a plasticidade neural do enxerto em resposta à diferença fisiológica dos receptores (JUANG et al., 2014).

As células beta-pancreáticas tem sido alvo de estudos aprofundados devido à grande demanda de novos casos de Diabetes mellitus em humanos e animais, principalmente por serem pouco esclarecidas suas causas e consequências, sendo as últimas, diversas, podendo até levar a morte. Acredita-se que nesta área esteja a resposta para inovar em tratamentos e encontrar a possível cura desta doença

(VOLTARELLI et al., 2009; SKELIN; RUPNIK; CENCIC, 2010; RAHMATI; ALIJANI; KADIVAR, 2013; BEREZIN, 2014; LOPEZ et al., 2014; LIN et al., 2015).

Células musculares caninas induzidas podem produzir e secretar insulina canina, em transfecção com DNA plasmidial não-viral, contendo um gene mutante canino pré-pro-insulina, sendo esta uma opção para o tratamento da Diabetes mellitus em cães, ou mesmo para proporcionar uma fonte constante de insulina, assim como o peptídeo C (NIESSEN et al., 2012).

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (TIMPER et al., 2006), medula óssea (MORISCOT et al., 2005) e células-tronco beta-pancreáticas (SEEBERGER et al., 2006), têm potencial de se diferenciar e adotar um fenótipo pancreático em humanos e camundongos, uma vez que, após transfectar *PDX1*, *Beta2* e *Mafa*, fatores essenciais ao desenvolvimento pancreático às células de medula óssea canina, e avaliar a produção de insulina, confirmou-se tal modificação (TAKEMITSU et al., 2013).

No entanto, apesar dos estudos utilizando o cão como modelo experimental, a literatura científica é limitada em trabalhos que estabeleçam um protocolo de obtenção e caracterização de células do pâncreas fetal nesta espécie, destacando a importância do presente estudo, inovando em possíveis caminhos para terapia celular em cães.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar células derivadas do pâncreas fetal canino visando no futuro à terapia celular em cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfolologicamente as células do pâncreas fetal canino em cultivo através da Microscopia de Luz, Microscopia Eletrônica de Varredura, e realizar Histologia do tecido pancreático;
- Realizar imunofenotipagem celular por Imunocitoquímica;
- Avaliar a tumorigenicidade das células derivadas do pâncreas fetal canino através da aplicação em camundongos balb-c *nude*.
- Investigar a presença de insulina no tecido pancreático através da coloração com Ditizona;
- Caracterizar o pâncreas de feto canino através de duplas marcações por Imunofluorescência;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para o presente estudo foram utilizados fetos de cão (*Canis lupus familiaris*) sem raça definida, com idade entre 50 e 60 dias de gestação, já eutanasiados, provenientes de campanha de castração da cidade de Embu das Artes – São Paulo, com o devido consentimento assinado pelos donos dos animais, seguindo as orientações e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo nº 4406140915.

As idades dos fetos caninos foram estimadas pela medida do *crown-rump*, distância em milímetros entre o ponto mais alto da cabeça e o ponto mais caudal das nádegas, na base da cauda (EVANS; SACK, 1973).

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E CULTIVO CELULAR

No laboratório, os fetos foram imediatamente lavados em água corrente e, posteriormente, em Solução Salina Fosfatada (PBS) (LGC Biotecnologia) 1x, suplementada com 5% antibióticos (penicilina/estreptomicina) (LGC Biotecnologia). Em fluxo laminar, com material devidamente esterilizado, foram realizadas incisões retro-umbilicais na cavidade abdominal dos fetos para dissecação e posterior coleta do tecido pancreático (Figura 1- A e B).

As amostras do tecido foram inicialmente lavadas por três vezes em solução de PBS 1x estéril contendo 5% de antibióticos, e fragmentadas mecanicamente com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de pequenas partes de tecido do pâncreas (explantes) (Figura 1 - C). Em seguida, as amostras foram incubadas em Soro Fetal Bovino (SFB) (LGC Biotecnologia) por 5 horas em estufa a uma temperatura de 37°C e atmosfera úmida a 5% de CO₂ e, posteriormente foi adicionado o meio de cultura (Figura 1-D). As células derivadas do pâncreas de fetos caninos foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's

Medium (DMEM)-Alta Glicose (LGC Biotecnologia), suplementado com 10% de SFB, 1% de estreptomicina/penicilina e 1% de aminoácidos não essenciais. Estas células foram expandidas em cultura e posteriormente congeladas para posterior caracterização.

Figura 1 - Obtenção das amostras

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2015).

Legenda: A- Feto canino com aproximadamente 55 dias de gestação; B- Pâncreas fetal canino (setas); C-Fragmentação mecânica do órgão com auxílio de bisturi; D- Incubação em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 8 horas, seguida de adição do meio de cultivo DMEM-Alta Glicose.

3.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CULTIVO CELULAR

A descrição morfológica das células do pâncreas de feto canino principalmente em segunda e quarta passagens, foi realizada através da avaliação diária das placas de cultivo, sendo fotografadas periodicamente com o uso de microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100).

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As células derivadas de pâncreas fetal canino foram cultivadas em lâmina de vidro previamente esterilizada, e esta foi acondicionada em placa de Petri 100 mm (JetBiofil) com meio de cultivo e incubou-se em estufa a 37° C e atmosfera úmida a

5% de CO₂. Após as células atingirem a confluência entre 70% e 80%, retirou-se o meio de cultivo, lavaram-se as células três vezes cuidadosamente com PBS e fixou-se com 4% paraformaldeído. Após 2 horas, o fixador foi retirado e as placas foram lavadas novamente em PBS, e pós-fixadas em 1% tetródioxo de ósmio por uma hora, seguida de lavagens em água destilada e desidratação em série crescente de álcool etílico (50° - 100°), e posterior secagem em estufa a 37°C. Em seguida, foram submetidas a um revestimento metálico ("*sputting*") com ouro no aparelho metalizador EMITECH K550, e analisadas e fotografadas em microscópio de varredura (LEO 435VP).

3.4 IMUNOCITOQUÍMICA

Para realizar a imunofenotipagem celular por imunofluorescência, foram plaqueadas 10⁴ células em lamínula de vidro circular 15 mm (Glasscyto), e colocadas em placas de cultivo 24 poços, sendo incubadas em meio DMEM-Alta Glicose durante 48 horas. Após atingirem 70% de confluência, retirou-se o meio de cultivo, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com 4% paraformaldeído. Em seguida lavou-se em solução de PBS para retirar o fixador. Para as amostras nas quais foram adicionados anticorpos com marcações nuclear ou citoplasmática, foi realizada a permeabilização da membrana celular através da adição de Triton a 0,1% (LGC Biotecnologia, Brasil) por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com PBS. Em seguida, para evitar reações inespecíficas, foi realizado bloqueio com solução tampão IF 1:1 [(Triton 0,2% + Tween 20) + 2% Albumina Sérica Bovina (BSA)] (LGC Biotecnologia) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, foram incubados com os anticorpos primários por 24 horas a 4°C, os quais foram PDX1 (fator de transcrição específico para células pancreáticas precursoras de células beta produtoras de insulina), PCNA (anticorpo marcador de proliferação celular) e Nanog (anticorpo marcador de pluripotência celular) (Quadro 1).

Quadro 1 -Descrição dos anticorpos primários para Imunocitoquímica

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição
Anti-PDX1 Policlonal coelho	Novus Biologicals	NBP2-22150	1:200
Anti-PCNA Monoclonal camundongo	Santa Cruz	sc-56	1:200
Anti-Nanog Monoclonal camundongo	BD Pharmigen	560278	1:50

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Após a primeira incubação, as células foram lavadas duas vezes, por 5 minutos cada, com PBS 1X e logo em seguida, incubadas com os anticorpos secundários (Quadro 2) por 1 hora à temperatura ambiente.

Quadro 2 - Descrição dos anticorpos secundários para Imunocitoquímica

Anticorpo	Fabricante	Diluição
Cabra anti-coelho IgG H+L Alexa Fluor® 488	Life Technologies	1:500
Cabra anti-camundongo IgG Alexa Fluor® 488	Life Technologies	1:500

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Depois de três lavagens, de 5 minutos cada, com PBS 1x, as lâminas foram montadas com Vectashield com 2,6-diamino-2fenilindole diclorato (DAPI) (Vector Laboratories, EUA), e analisadas em microscópio Luz Confocal a Laser FV 1000 (Olympus), através do software Olympus FluoView versão 3.1, do Departamento de Cirurgia, área de Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres, FMVZ-USP.

3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Foram utilizados 2 camundongos Balb-c^{nu/nu}, adquiridos no biotério de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL).

Após o crescimento celular adequado, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e lavadas com PBS 1x. Posteriormente, o

precipitado foi ressuspenso em 100 µL de meio de cultivo DMEM-Alta Glicose sem SFB e 10^6 células de pâncreas fetal canino foram injetadas no tecido subcutâneo da região dorsal com auxílio de agulha de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada semanalmente durante o período de oito semanas. Após este período, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Amostras do bíceps, fígado, pulmão, rim, coração, cérebro e pâncreas foram coletados e fixados em formaldeído a 10% e, então, realizado o protocolo de desidratação, diafanização, inclusão em parafina e secção a 5µm em micrótomo, montagem das lâminas, coloração com Hematoxilina - Eosina (HE) e investigação em microscópio Olympus (CX 31 RBSFA) para exame histopatológico.

3.6 COLORAÇÃO COM REAGENTE DITIZONA

Neste estudo, o reagente foi utilizado para corar células de ilhotas pancreáticas em feto canino, no intuito de identificar a presença de insulina no tecido.

Para tanto, diluiu-se 100 mg de Ditizona (LGC Biotecnologia, Brasil) em 20 mL de DMSO (LGC Biotecnologia, Brasil) e adicionou-se 30 mL de PBS. Em seguida a solução foi filtrada em filtro de 0,45 µm, mantendo-a ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após preparada a solução de Ditizona, adicionou-se 100µL da solução em placa contendo amostras de tecido pancreático digerido com Colagenase I, e observou-se em microscópio óptico Leica DME.

3.7 HISTOLOGIA DO TECIDO PANCREÁTICO

Para avaliação histológica, amostras do pâncreas fetal canino foram fixadas em 4% paraformaldeído por 48 horas. Após a fixação o material foi lavado em PBS, seguido de desidratação em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%), seguido de diafanização em xilol, para, então, serem embebidos em similar de parafina (Histosec) (TOLOSA et al., 2003).

Os blocos foram cortados a 5 µm em micrótomo automático (Leica, RM2165, Germany) onde os cortes foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60° C. Após serem desparafinizados os cortes, foram corados com a técnica de Hematoxilina e Eosina.

Em seguida, as lâminas foram analisadas e as características morfológicas fotodocumentadas em microscópio Nikon 80i.

3.8 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os experimentos e análises relacionados a esta técnica foram realizados no Laboratório de Neurogastroenterologia, do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob a supervisão da Profa. Dr^a. Patricia Castelucci.

3.8.1 Técnica de Fixação e Congelamento

Os fetos de cão foram dissecados, o pâncreas foi removido e imerso em solução fixadora de paraformaldeído a 4% a 4°C por 24h. Após, a fixação, os pâncreas foram imersos em solução crioprotetora de sacarose a 30% em 0,1M tampão fosfato de sódio a 4°C durante 24h. Após esse período, as amostras foram embebidas em solução contendo 50% sacarose a 30% e 50% *Tissue-Tek OCT compound* (SakuraFinetek) por 24h. Em seguida retirou-se esta solução e adicionou-se *Tissue-Tek OCT compound* por 24h e foram congelados em gelo seco mais álcool absoluto. Depois de congelados, foram armazenados em freezer -80°C e cortados em criostato em secções de 10µm.

3.8.2 Métodos de Dupla Marcação por Imunofluorescência

As lâminas com cortes de pâncreas foram descongelados por cerca de 1 hora a temperatura ambiente e pré-incubados em solução 10% de Solução de Soro Normal de Cavalo em 1,5% de Triton-X (Sigma) e PBS durante 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados em anticorpos primários (Quadro 3) e colocados em caixa úmida escura por 48h a 4°C.

A obtenção das duplas marcações foi feita através do uso de combinações do anticorpo primário Insulina com os seguintes anticorpos: PDX1, PCNA, Somatostatina e TH. Também foram realizadas duplas marcações através de combinações do anticorpo PDX1 com o PCNA, e PDX1 com Nanog e do anticorpo Somatostatina com TH.

Quadro 3 - Descrição dos anticorpos primários para Imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição
Cobaia Anti-Insulina Policlonal	Abcam	Ab7842	1:200
Coelho Anti-PDX1	Novus Biologicals	NBP2-22150	1:200
Camundongo Anti-PCNA	Santa Cruz	sc-56	1:200
Camundongo Anti-Nanog	BD Pharmigen	560278	1:50
Coelho Anti-Somatostatina	Chemicon	Ab5494	1:100
Carneiro Anti-TH	Chemicon	Ab1542A	1:100

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Após a incubação com os anticorpos primários, os tecidos foram lavados com PBS por três vezes, com duração de 10 minutos cada e, em seguida, incubados em anticorpos secundários (Quadro 4) durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse tempo, os cortes foram novamente lavados com PBS por 3 vezes, com duração de 10 minutos cada lavagem. Em seguida, os cortes foram incubados com DAPI para marcação nuclear, durante 3 minutos. Durante toda a realização da técnica, os cortes foram mantidos em caixa escura úmida. Após os 3 minutos, os cortes foram lavados com PBS, por 3 vezes de 5 minutos. Os cortes foram montados

com Glicerol tamponado com 0,5M de tampão carbonato de cálcio, pH 8,6 (CASTELUCCI et al., 2002).

Quadro 4 - Descrição dos anticorpos secundários para Imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Diluição
Cabra anti-cobaia IgG H&L DyLight® 488	Abcam	1:200
Burro anti-coelho IgG Alexa Fluor® 488	Molecular Probes	1:500
Burro anti-coelho IgG Alexa Fluor® 594	Molecular Probes	1:200
Burro anti-camundongo IgG Alexa Fluor® 488	Molecular Probes	1:200
Burro anti-camundongo IgG Alexa Fluor® 594	Molecular Probes	1:200
Burro anti-carneiro IgG Alexa Fluor® 594	Molecular Probes	1:500

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

3.8.3 Análise Quantitativa de Colocalização Celular

Para o método de análise de colocalização, foram realizadas duplas marcações de Insulina com PDX1, Insulina com PCNA, Insulina com Somatostatina, Somatostatina com TH, PDX1 com PCNA e PDX1 com Nanog, no pâncreas de feto canino, foram utilizadas. Primeiramente, uma célula positiva para Insulina, na cor verde, com fluorocromo com comprimento de onda de 488, foi identificada e em seguida o filtro foi trocado para verificar se a imunorreatividade celular também se dava na marcação com anti-PDX1, marcado na cor vermelha, através do fluorocromo de comprimento de onda 594, para demonstrar se haveria colocalização celular dos dois marcadores. Em seguida, foi trocada a ordem de identificação da célula imunorreativa, começando por uma célula positiva para PDX1 e depois trocando o filtro para verificar se a mesma célula era imunorreativa também para a Insulina. O mesmo procedimento foi realizado com as demais duplas marcações mencionadas acima (CASTELUCCI et al., 2002).

Os dados das duplas marcações foram expressos com a média e desvio padrão do número de cortes analisados. Foram contadas vinte e cinco células por corte para as duplas marcações de Insulina com PDX1, Insulina com PCNA, Insulina com Somatostatina, Somatostatina com TH, PDX1 com PCNA e PDX1 com Nanog,

na objetiva de 100X. Foram utilizados 4 cortes de cada um dos 3 animais, totalizando 100 células contadas por animal.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CULTIVO CELULAR

As células de pâncreas fetal canino possuíam morfologia fibroblastóide, aderentes ao plástico, sendo facilmente expandidas *in vitro*, observando-se 80% de confluência celular após o oitavo dia de cultivo. Na Figura 2 é possível observar células destacando-se do tecido (*) em cultivo primário (A) na segunda passagem aderidas à placa de cultivo destacando sua forma fibroblastóide (seta B). A análise morfológica das células em cultivo foi realizada periodicamente, utilizando microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100).

Figura 2 - Análise morfológica do cultivo celular

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2015).

Legenda: Fotomicrografia obtida por Microscópio de Luz Invertido mostrando células derivadas de pâncreas fetal canino em (A) cultivo celular primário por explante (*) e (B) células em segunda passagem. Aumento 4x e 10x, respectivamente.

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura do Cultivo Celular

A análise das células do pâncreas em quarta passagem, feita em microscópio Eletrônico de Varredura (LEO 435VP), mostrou o formato fibroblastóide da monocamada celular (Figura 3A), as células possuíam citoplasma alongado e núcleo centralizado (Figura 3B seta).

Figura 3 - Análise morfológica do cultivo celular por Microscopia Eletrônica de Varredura

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2015).

Legenda: Fotomicrografia obtida por Microscópio Eletrônico de Varredura de células pancreáticas em quarta passagem em (A) o cultivo celular, com formação de monocamada e (seta em B) presença de citoplasma alongado e núcleo centralizado.

4.2 IMUNOCITOQUÍMICA

As células de pâncreas fetal canino apresentaram-se imunopositivas para PDX1 (Figura 4 – A, B e C), além de possuírem pluripotência e capacidade proliferativa, observada pela imunorreatividade do anticorpo PCNA (Figura 4 – D, E e F), e Nanog respectivamente (Figura 4 – G, H e I).

Figura 4 - Caracterização celular por Imunocitoquímica

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2015).

Legenda: Fotomicrografia obtida por Microscópio Confocal, exibindo células de pâncreas fetal canino em cultivo celular em segunda passagem, com imunomarcagem para os anticorpos: PDX1 (A e C seta), Nanog (D, e F - seta), PCNA (G e I - seta). Marcação nuclear realizada com DAPI (B, E e H). Aumento 40x.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Após o período de oito semanas da aplicação subcutânea de 10^6 células de pâncreas fetal canino em dois camundongos balb-c nude, não foram observadas formações tumorais após análise macroscópica (Figura 5 - A, B e C).

Para análise microscópica os animais foram eutanasiados, dissecados, foram coletadas amostras de coração, fígado, rim, pulmão, cérebro, pâncreas e bíceps. Estes foram processados histologicamente, corados com Hematoxilina-Eosina, e após análise histopatológica, confirmou-se que os tecidos não apresentaram qualquer alteração que pudesse estar relacionada à formação tumoral (Figura 5 – D a Q).

Figura 5 - Avaliação do Potencial Tumorigênico

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Legenda: Fotomacrografia de camundongo nude e órgãos coletados para histologia após aplicação de células de pâncreas de feto canino para ensaio do potencial tumorigênico. A - Local de aplicação das células (seta); B - Camundongo em decúbito ventral; C - Camundongo dissecado demonstrando que não há formação tumoral; D e E - Coração; F e G - Fígado; H e I - Rim; J e K - Pulmão; L e M - Cérebro; N e O - Pâncreas; P e Q - Bíceps. Barra macroscopia: 1cm.

4.4 COLORAÇÃO COM REAGENTE DITIZONA

Utilizou-se o reagente Ditizona (LGC Biotecnologia, Brasil) para corar células de ilhotas pancreáticas, especificamente a presença de insulina, corando-as em vermelho e possibilitando sua identificação.

Após coloração do tecido pancreático fresco, foi possível observar insulina em vermelho formando ramificações dispersas pelo tecido exócrino (Figura 6 A e B).

Figura 6 - Coloração com Ditizona

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2015).

Legenda: Fotomicrografia obtida de Microscópio Óptico de Luz mostrando coloração com reagente Ditizona em tecido pancreático fetal canino com 54 dias gestacionais após 30 minutos em Colagenase I. Observa-se marcação em vermelho constatando a presença de insulina no tecido. Aumento 10x e 20x, respectivamente.

4.5 HISTOLOGIA DO TECIDO PANCREÁTICO

O pâncreas fetal canino apresentou formato glandular, sendo constituído em maior quantidade de células pancreáticas exócrinas, arranjadas em ácinos que subsequentemente formavam os lóbulos do pâncreas, os quais estavam conectados por septos de tecido conjuntivo irrigados por vasos sanguíneos (Figura 7 – setas). Quando a parte endócrina, nessa fase do desenvolvimento pancreático em cães, as

ilhotas ainda apresentavam formato irregular, dispersas por entre os ácinos, de difícil visualização, mas foi possível identificar aglomerados celulares com arranjo diferente da porção exócrina e geralmente próxima a rede vascular (Figura 7 – círculos).

Figura 7 - Histologia do tecido pancreático

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Legenda: Fotomicrografia obtida de microscópio óptico de luz da histologia do lobo esquerdo (cauda) do pâncreas de feto canino com 54 dias gestacionais, onde observam-se os ácinos (setas) e regiões onde se acredita serem as ilhotas pancreáticas (círculos) e vasos sanguíneos irrigando o parênquima pancreático (vs). Barras 50µm.

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

A partir da técnica de imunohistoquímica de fluorescência indireta, com dupla marcação em cortes do pâncreas de feto canino. Foi possível observar a presença da Insulina, PDX1, PCNA, Nanog, Somatostatina e TH, no tecido pancreático.

Os hormônios Insulina e Somatostatina apresentaram-se em células distribuídas no pâncreas, sempre próximas, na mesma região onde pode-se inferir que seja a ilhota pancreática endócrina, responsável por produzir os principais hormônios, tais como insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático.

O PDX1, por sua vez, apresentou-se em células por todo o pâncreas, devido ao fato do PDX1 ser um fator de transcrição necessário ao desenvolvimento pancreático.

O TH, marcador simpático, apresentou-se em fibras nervosas, responsáveis pela inervação do pâncreas, dispostas especialmente por entre os ácinos exócrinos e ductos pancreáticos.

O Nanog, marcador de pluripotência celular, apresentou-se em células dispersas pelo tecido e próximo aos vasos sanguíneos, destacando a presença de células pluripotentes em pâncreas de fetos caninos em fase final de gestação.

A análise qualitativa permitiu observar que houve colocalização de células imunorreativas a Insulina (ir) com PDX1 (Figura 8 – A, A', A'' e A'''), e não houve colocalização de células Insulina-ir com PCNA-ir (Figura 7 – B, B', B'' e B''') e Insulina-ir com Somatostatina-ir (Figura 8 – C, C', C'' e C''')

Na figura 9 observam-se duplas marcações de células Somatostatina-ir com TH-ir (Figura 9 – A, A', A'' e A'''), PDX1-ir com PCNA-ir (Figura 9 – B, B', B'' e B''') e PDX1-ir com Nanog-ir (Figura 9 – C, C', C'' e C'''), no entanto, não foi possível observar colocalização celular em nenhuma das duplas marcações citadas.

Figura 8 - Pâncreas de feto canino com aproximadamente 57 dias de gestação marcado pela Insulina, PDX1, PCNA, Somatostatina e DAPI

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Legenda: Células pancreáticas imuno-reativas a Insulina-ir (A), PDX1 (A'), DAPI (A'') demonstradas por seta vazada indicando não colocalização de células Insulina-ir (A) e PDX1-ir (A'). Seta cheia demonstra colocalização de células Insulina-ir e PDX1-ir (A, A'). Células pancreáticas imuno-reativas a Insulina-ir (B), PCNA-ir (B'), DAPI (B''), demonstradas por seta vazada indicando não colocalização de células Insulina-ir e PCNA-ir (B, B'). Células pancreáticas imuno-reativas a Insulina-ir (C), Somatostatina (C'), DAPI (C''), demonstradas por seta vazada indicando não colocalização de células Insulina-ir e Somatostatina-ir (C, C'). Barras: 20µm e 100 µm.

Figura 9 - Pâncreas de feto canino com aproximadamente 57 dias de gestação marcado pela Somatostatina, TH, PDX1, PCNA, Nanog, e DAPI

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Legenda: Células pancreáticas imunorreativas a Somatostatina-ir (A), TH (A'), DAPI (A'') demonstradas por seta vazada indicando não colocização de células Somatostatina-ir e TH-ir (A, A'). Células pancreáticas imunorreativas a PDX1-ir (B), PCNA-ir (B'), DAPI (B''), demonstradas por seta vazada indicando não colocização de células PDX1-ir e PCNA-ir (B, B'). Células pancreáticas imunorreativas a PDX1-ir (C), Nanog (C'), DAPI (C''), demonstradas por seta vazada indicando não colocização de células PDX1-ir e Nanog-ir (C, C'). Barras: 100 μm e 20 μm.

A análise quantitativa, do tecido pancreático de feto canino, demonstrou que em duplas marcações de células imunorreativas a Insulina com PDX1, $92,6 \pm 2,3\%$ das células eram imunorreativas somente para Insulina, e a porcentagem de células que colocizaram com Insulina e PDX1 foi de $7 \pm 2,3\%$. Na análise inversa, as células imunorreativas PDX1 e Insulina, $92 \pm 1\%$ das células eram imunorreativas somente ao PDX1, e $8 \pm 1\%$ das células eram imunorreativas ao PDX1 com Insulina (Tabela 1).

A análise quantitativa do tecido pancreático de feto canino demonstrou que em duplas marcações de células imunorreativas a Insulina com PCNA, 100% das

células eram imunorreativas apenas para Insulina. Ao analisar o PCNA, 100% das células eram imunorreativas somente para PCNA, ou seja, não houve colocalização de células imunorreativas ao PCNA com Insulina (Tabela 1).

Com relação às duplas marcações de células imunorreativas a Insulina com Somatostatina, 100% das células do pâncreas de feto canino eram imunorreativas apenas para Insulina. Ao analisar a Somatostatina, 100% das células eram imunorreativas apenas para o anticorpo Somatostatina, sendo assim, não houve colocalização de células imunorreativas à Insulina com Somatostatina (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise quantitativa das duplas marcações a Insulina com PDX1, Insulina com PCNA e Insulina com Somatostatina, em células do pâncreas fetal canino

Marcadores	%
Insulina + / - Insulina + / PDX1 +	92,6 ± 2,3% 7 ± 2,3%
PDX1 + PDX1 + / Insulina +	92 ± 1% 8 ± 1%
Insulina + / - Insulina + / PCNA +	100% 0%
PCNA + / - PCNA + / Insulina +	100% 0%
Insulina + / - Insulina + / Somatostatina +	100% 0%
Somatostatina + / - Somatostatina + / Insulina +	100% 0%

Os dados são de n=3 em Média ± desvio padrão.

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

Na tabela 2 observam-se duplas marcações no tecido pancreático de feto canino de células imunorreativas a Somatostatina com TH, 100% das células foram imunorreativas apenas para Somatostatina. Na análise inversa, 100% das células foram imunorreativas somente ao anticorpo TH, ou seja, não houve colocalização de células imunorreativas à dupla Somatostatina com TH.

Com relação à dupla marcação de células imunorreativas a PDX1 com PCNA, 97 ± 1% eram imunorreativas somente para PDX1 e 3 ± 1% das células eram imunorreativas a PDX1 com PCNA. Na análise inversa, 97 ± 2% das células eram

imunorreativas apenas para PCNA e $3 \pm 2\%$ das células eram imunorreativas ao PCNA com PDX1 (Tabela 2).

A análise quantitativa do tecido pancreático de feto canino demonstrou que em duplas marcações de células imunorreativas a PDX1 com Nanog $91,6 \pm 1,5\%$ eram imunorreativas apenas para PDX1 e $8,3 \pm 1,5\%$ das células eram imunorreativas a PDX1 com Nanog. Na análise inversa, o Nanog, $89,3 \pm 2,8\%$ das células eram imunorreativas para Nanog e $11 \pm 2,8\%$ das células eram imunorreativas ao Nanog e PDX1 (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise quantitativa das duplas marcações a Somatostatina com TH, PDX1 com PCNA e PDX1 com Nanog em células do pâncreas fetal canino

Marcadores	%
Somatostatina + / -	100%
Somatostatina + / TH +	0%
TH + / -	100%
TH + / Somatostatina +	0%
PDX1 + / -	$97 \pm 1\%$
PDX1 + / PCNA +	$3 \pm 1\%$
PCNA + / -	$97 \pm 2\%$
PCNA + / PDX1 +	$3 \pm 2\%$
PDX1 + / -	$91,6 \% \pm 1,5\%$
PDX1 + / Nanog +	$8,3 \pm 1,5\%$
Nanog + / -	$89,3 \pm 2,8\%$
Nanog + / PDX1 +	$11 \pm 2,8\%$

Os dados são de n=3 em Média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: (AGUIAR, B. A., 2016).

5 DISCUSSÃO

É importante rever o pâncreas do cão na fase final da gestação, sob seus aspectos estruturais, incluindo sua morfologia com especial atenção à sua composição celular. Os cães com idades compreendidas entre 50 a 60 dias gestacionais podem ser considerados relevantes para ampliar os estudos sobre doenças metabólicas tais como a Diabetes mellitus, uma vez que essa espécie tem se mostrado como um modelo viável para estudos comparativos com humanos, por suas semelhanças fisiológicas, e por apresentarem doenças de decorrência natural e não induzidas. Outro fato relevante é a escassez de estudos que utilizem essa espécie em idades gestacionais, havendo na maioria das vezes utilização de animais jovens e adultos.

A caracterização de células derivadas do pâncreas fetal canino, visando ser esta uma possível fonte celular para a obtenção de células aplicadas ao tratamento de doenças tais como Diabetes mellitus, que acometem a espécie, corrobora em parte com autores como Son et al. (2010). Este grupo de pesquisa utilizou cães jovens (4 a 52 semanas de idade) para estudar a ocorrência espontânea da proliferação de células endócrinas extra-ilhota pancreáticas nesses animais. Shields et al. (2015) utilizaram uma coleção de pâncreas de cães diabéticos (com idade de 3 meses a 15,5 anos - média de 8 anos), para realizar análise histopatológica e caracterizar as ilhotas pancreáticas. No entanto, o presente estudo difere de autores que optaram pelo modelo canino, mas utilizaram outros órgãos como fontes de estudo, tais como Niessen et al. (2012), que estudaram cães da raça Beagle de 18 meses de idade, com o intuito de produzir insulina madura, a partir de músculo estriado canino através da terapia gênica. Já Lee et al. (2012), microencapsularam células das ilhotas pancreáticas de ratos, com condrócitos de orelha canina imunoisoladas, e obtiveram ilhotas com capacidade de secreção de insulina em longo prazo, observando assim o potencial para aplicação clínica de transplante de ilhotas pancreáticas através da veia porta. A seu turno, Takemitsu et al. (2013) geraram células produtoras de insulina mediante a transfecção dos genes de *PDX1*, *Beta2* e *Mafa* em células-tronco derivadas da medula óssea canina de cães da raça Beagle jovens, os quais tiveram, segundo os autores, importante papel na expressão do mRNA e proteína da insulina. O interesse por outros órgãos, além do pâncreas,

com foco no tratamento da Diabetes em cães, pode ser justificado pelas dificuldades de obtenção de material da espécie, por questões éticas, por preferência por outras fontes celulares, pelo nível e exigência das técnicas elaboradas pelos autores ou mesmo pela inovação dos tratamentos aplicados à espécie canina.

A preferência pelo modelo canino é cada vez maior, visando o aprimoramento das terapias utilizando insulina, como visto por Pöppel et al. (2006). Esses autores estudaram cães diabéticos com idade compreendidas entre 8 e 12 anos, objetivando avaliar a resposta clínico-laboratorial a uma terapia alternativa feita por injeção de insulina suína lenta utilizada uma vez por dia. Por sua vez, Davison et al. (2003) estabeleceram a incidência de anticorpos anti-insulina em pâncreas de cães diabéticos com idades médias de 9,6 anos tratados com insulina bovina, e cães normoglicêmicos com idades médias de 5,2, não tratados. Os autores sugeriram que o tratamento de cães diabéticos com insulina bovina pode levar a produção de anticorpos anti-insulina.

As células derivadas de pâncreas fetal canino apresentaram-se em cultivo por monocamada de células com morfologia fibroblastóide, citoplasmas alongados e núcleos centralizados, quando utilizado o meio DMEM-Alta Glicose. Para Kahan et al. (2003) o meio de cultivo DMEM-Alta Glicose não suplementado, suportou a diferenciação progressiva de células-tronco embrionárias de camundongos, caracterizando a diferenciação de precursores endócrino-pancreáticos, bem como a formação dos quatro principais tipos celulares das ilhotas pancreáticas. Kim et al. (2010) utilizaram o mesmo meio de cultivo para diferenciar células-tronco embrionárias de camundongo em células produtoras de insulina. Já Niessen et al. (2012) utilizaram meio DMEM para gerar uma linhagem celular derivada de músculo canino, capaz de serem induzidas por terapia gênica a expressar insulina. Assim, Greggio et al. (2014) propuseram um modelo que reproduz a arquitetura 3D do pâncreas, descoberta útil para estudar a morfogênese, a partir de células epiteliais pancreáticas murinas, (10.5 dias gestacionais embrionários) utilizando meio de cultivo DMEM-F12.

O pâncreas de feto canino apresenta ácinos pancreáticos num estágio de organização já avançado, com parênquima pancreático semelhante ao do cão adulto. No entanto há certa dificuldade em distinguir as ilhotas pancreáticas, pois estas se distribuem no tecido de maneira irregular em pequenos aglomerados de células, por entre os ácinos, especialmente próximas a vasos sanguíneos. Nesse

aspecto Gupta et al. (2002) observaram que em humanos, a organização do parênquima em lobos e lóbulos tem seu início de desenvolvimento em fetos de 12 semanas de idade, estando melhor definido de 14 - 15 semanas de idade. Nesta fase os brotos de células destinadas a formar ilhotas pancreáticas, foram vistos próximos a um grupo de capilares no período de 13-14 semanas. A cápsula de tecido conjuntivo frouxo foi vista pelos autores, em torno das ilhotas pancreáticas em desenvolvimento, separando-os do tecido acinar. No entanto, algumas ilhotas, segundo os autores, permaneciam situadas em contato direto com os ácinos. Para Gittes (2009) no período compreendido entre 14º a 18º dias embrionários no pâncreas de camundongo, a localização das novas células endócrinas permitem o acúmulo das mesmas ao longo dos ductos e vasos sanguíneos. Já em cães adultos, é possível distinguir facilmente as ilhotas pancreáticas em cortes histológicos, como foi demonstrado por Wieczorek, Pospischil e Perentes, (1998), ou seja, a presença de células endócrinas individuais ou pequenos grupos celulares no lobo direito do pâncreas canino. Ao contrário dos cães, o pâncreas de roedores, apresenta as ilhotas pancreáticas morfologicamente distintas, tipicamente dispostas por entre o parênquima pancreático, demonstrando cito-arquitetura que pode ser observada na fase inicial de desenvolvimento pós-natal (neonatal), e até mesmo na fase de adulta da espécie (CARVALHO et al., 2006; GITTES, 2009). É sabido que o tamanho e a composição celular das ilhotas pancreáticas, em cães, têm uma variabilidade de acordo com sua localização no pâncreas. Por sua vez, a cauda do pâncreas tende a conter ilhotas que são grandes e compactas, enquanto que a cabeça do órgão contém pequenas ilhotas e células individuais, muito embora aglomerados de algumas células sejam encontradas em tecidos conjuntivos adjacentes, e nos ductos exócrinos. Assim, propõe-se que mudanças no arranjo das ilhotas aconteçam em resposta a estados metabólicos dentro de uma única espécie, e esta plasticidade pode refletir a adaptação evolutiva adquirida, induzida por condições fisiológicas alteradas, no lugar das disparidades inerentes entre as espécies (SON et al., 2010; STEINER et al., 2010; SHIELDS et al., 2015).

O tecido pancreático fetal de cão apresenta aglomerados de células pancreáticas com insulina corada em vermelho com Ditizona, como observado por Huang, Lu e Hsu (2003) que utilizou a mesma coloração para corar seletivamente ilhotas pancreáticas caninas. Para Shiroy et al. (2002) os estudos com cultivo de células-tronco embrionárias de camundongos, após aproximadamente 16 dias,

demonstraram que células coradas com Ditzona foram imunorreativas com anticorpos insulina, PDX1, pró-insulina I e II com outros componentes pancreáticos.

O pâncreas de feto canino apresentou imunomarcção para os anticorpos Insulina, Somatostatina PDX1, PCNA, Nanog e TH. De fato em pâncreas de cães adultos saudáveis, a presença do hormônio insulina é ativa, como comprovada por Asadi, Bruin e Kieffer (2015), que estudaram a especificidade do anticorpo insulina em várias espécies, observando que o pâncreas de cão adulto foi positivo para insulinas e pró-insulina. Já nesta fase do desenvolvimento canino, a presença de insulina pode ser comparada à presença de insulina no pâncreas de fetos de ratos e humanos. Gupta et al. (2002) observou agregações densas de grânulos em células alfa e beta de pâncreas fetal humano, com 22 - 24 semanas de gestação, o que pode estar associado com a quantidade de insulina segregada pelo órgão. Já para Carvalho et al. (2006), em estudos com ratos neonatos, jovens e adultos demonstraram que em neonatos as ilhotas pancreáticas são relativamente pobres em insulina secretada, comparada aos adultos. Além disso, as ilhotas pancreáticas demonstraram morfologia desorganizada, com pouca forma definida, e estruturas ductais dentro ou próximo às ilhotas pancreáticas.

O número de células que expressam somatostatina apareceu proporcional ao número total de células endócrinas, presente em diferentes áreas do pâncreas quer isolado entre células acinares ou nas ilhotas pancreáticas, sempre próximas, mas não colocalizando, com as células insulina positivas. Foi possível observar células individuais positivas a somatostatina perto de ductos pancreáticos. Estes resultados corroboram com os dados encontrados em pâncreas canino por Wieczorek; Pospischil; Perentes (1998) que em análise comparativa imunohistoquímica do pâncreas, também encontraram células somatostatina positivas no tecido em menor número. Shields et al. (2015) por sua vez, classificaram as células produtoras de somatostatina juntamente com as células PP, como sendo 10% dos componentes celulares das ilhotas pancreáticas em cães. Considerando a importância deste hormônio, juntamente com os outros componentes da ilhota pancreática endócrina, nessa fase final do desenvolvimento canino, é possível encontrar células produtoras de somatostatina exercendo sua função corretamente.

O fator de transcrição PDX1 é geralmente reconhecido como o mais antigo marcador específico das células derivadas da endoderme do pâncreas. As células que o expressam representam os progenitores de todos os tipos de células

pancreáticas maduras, incluindo células endócrinas, exócrinas e ductos (SPAGNOLI, 2007). Em dupla marcação por imunofluorescência, os pâncreas de fetos caninos apresentaram imunomarcação para o hormônio Insulina. No entanto, houve pouca colocalização com PDX1 (~8%), diferindo do pâncreas de fetos humanos estudados por Lyttle et al. (2008). Estes autores demonstraram que 38% e 58% de células positivas para Insulina, expressam PDX1 em fetos entre 8 e 21 semanas, respectivamente, sugerindo o seu envolvimento na maturação e manutenção das células beta do órgão.

Células do pâncreas canino em fase final de gestação apresentaram proliferação celular (PCNA). No entanto não houve coexpressão com o hormônio Insulina. Tal achado corrobora com os resultados de Wieczorek, Pospischil e Perentes (1998). Os autores demonstraram em análise imunohistoquímica de ilhotas de cães, ratos, miniporcos e primatas não humanos, que o pâncreas exócrino apresentou um número elevado de núcleos de células em proliferação e raramente células das ilhotas raramente mostraram imunorreatividade para PCNA. Para os autores, isto se deve ao fato de que, em adultos, células beta são altamente diferenciadas com uma baixa capacidade proliferativa. Assim apenas uma pequena percentagem (menos de 3%) destas células, entram no ciclo celular proliferativo, justificando a não colocalização de células entre PDX1 e PCNA tampouco, hormônio Insulina e o anticorpo PCNA demonstrados nesse estudo. A seu turno, Carvalho et al. (2006) também observaram que em ratos neonatos há um aumento de imunorreatividade do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), quando comparados aos resultados obtidos em ratos jovens e adultos. Enquanto Son et al. (2010) demonstraram proliferação espontânea das células das ilhotas pancreáticas em cães jovens, Shields et al. (2015) praticamente não encontraram proliferação de células das ilhotas endócrinas nem das células beta em ambos os grupos de cães adultos controles ou diabéticos.

O pâncreas de feto canino apresentou fibras nervosas simpáticas imunopositivas para o anticorpo TH, dispersas por todo tecido por entre os ácinos, próximas às redes vasculares, além de não ser possível observar nenhuma coexpressão das fibras nervosas com células endócrinas das ilhotas. Os padrões de inervação simpáticas demonstrados neste estudo, corroboram com os dados Rodriguez-diaz et al. (2012), que utilizaram TH para demonstrar os padrões das fibras simpáticas que inervam as ilhotas pancreáticas humanas, demonstraram que

ilhotas humanas são pouco innervadas pelo sistema nervoso autônomo, sendo a maioria dos axônios neuronais penetrantes das ilhotas humanas provavelmente são células simpáticas e de contato contráteis com vasos sanguíneos dentro da ilhota. Segundo o grupo, células endócrinas são escassamente innervadas, ou seja, eles geralmente não têm as associações estreitas com axônios que definem junções efectoras autonômicas. Além de indicarem que o papel do sistema nervoso autônomo na regulação da função pancreática difere entre os seres humanos e roedores.

Mikhalski et al. (2014) através de dissecação anatômica de diferentes troncos nervosos que innervam o pâncreas, demonstrou semelhança entre seres humanos e cães adultos, confirmando a diferença dos padrões de innervação pancreática entre cães e roedores.

Em roedores, Juang et al. (2014) igualmente utilizando a Tirosina hidroxilase, demonstraram a reinervação simpática de ilhotas de camundongos enxertadas, assemelhando-se à innervação do pâncreas in situ. Slack (1995), relata que a innervação com células ganglionares e fibras amielínicas começa no estágio de 50 somitos e a vascularização aos 14 dias embrionários em camundongos, assim como Vázquez et al. (2014) a presença de células TH positivas no pâncreas de camundongos foi analisada em amostras de 11,5 e 15,5 dias embrionários, sendo esta última, a fase embrionária significativa durante a qual a innervação simpática por fibras começa.

Considerando que é geralmente assumido que o sistema nervoso autônomo afeta fortemente a secreção de hormônio da ilhota, os nossos resultados sugerem que pode existir uma correlação anatômica para uma influência neuronal indireta sobre as células endócrinas na ilhota canina, efeitos autonômicos pode ser mediada indiretamente, alterando o fluxo sanguíneo local afetando a secreção dos hormônios pelo pâncreas.

O pâncreas fetal canino apresentou células imunorreativas para Nanog, ainda que baixa. A imunorreatividade evidencia que ainda há células pluripotentes no tecido pancreático nessa fase do desenvolvimento canino. A co-expressão de marcadores associados à pluripotência por imunorreatividade para Nanog foi confirmada em células primárias proliferativas derivadas de pâncreas humanos adultos por White et al. (2011).

As células de pâncreas fetal canino não causam nenhuma formação tumoral, como avaliado em camundongos nude, o que as torna uma fonte viável de células

para estudos em terapia celular em cães, destacando que estudos que comprovem a produção de insulina *in vitro* por essas células, se fazem necessários.

6 CONCLUSÕES

As células pancreáticas de fetos caninos com idade entre 50 e 60 dias de gestação, em cultivo, apresentaram morfologia fibroblastóide e crescimento em monocamada, são pluripotentes e proliferativas e além de expressarem PDX1, um fator de transcrição que tem papel importante na ativação do gene promotor da insulina e não são tumorigênicas. O pâncreas apresenta inervação simpática observada pela presença de fibras nervosas imunopositivas a Tirosina hidroxilase.

Histologicamente apresentou ácinos num estágio de organização avançado, com parênquima pancreático semelhante ao do cão adulto e ilhotas pancreáticas distribuídas no tecido de maneira irregular em pequenos aglomerados de células por entre os ácinos, especialmente próximas a vasos sanguíneos. A coloração com Ditizona permitiu inferir a presença de insulina no tecido, o que foi comprovado através da técnica de imunofluorescência, também foram observadas células que expressavam somatostatina.

Nossos resultados indicam que o pâncreas fetal canino tem características favoráveis para torná-lo uma fonte viável de células para estudos em terapia celular em cães, destacando que estudos que comprovem a produção de insulina *in vitro* por essas células, se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. P.; HOLDER, A. L.; CATCHPOLE, B. Recombinant canine single chain insulin analogues: Insulin receptor binding capacity and ability to stimulate glucose uptake. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 436–442, 2014.

AKAZAWA, S.; AKAZAWA, S. Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model. **Congenital Anomalies**, v. 45, n. 3, p. 73–79, 2005.

ARVY, L. **Histoenzymology of the endocrine glands**. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1971.

ASADI, A.; BRUIN, J. E.; KIEFFER, T. J. Characterization of antibodies to products of proinsulin processing using immunofluorescence staining of pancreas in multiple species. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 63, n. 8, p. 646–662, 2015.

AYUSO, E.; CHILLÓN, M.; GARCÍA, F.; AGUDO, J.; ANDALUZ, A.; CARRETERO, A.; MONFAR, M.; MOYA, M.; MONTANÉ, J.; OTAEGUI, P. J.; BOSCH, F. In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 4, p. 747–755, 2006.

BEREZIN, A. E. Diabetes mellitus and cellular replacement therapy: expected clinical potential and perspectives. **World Journal of Diabetes**, v. 5, n. 6, p. 777, 2014.

BLUWOL, K.; DUARTE, R.; LUSTOZA, M.; SIMÕES, D.; KOGIKA, M. Evaluation of two portable meters for blood glucose measurements in dogs. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 1408–1411, 2007.

CARVALHO, C. P. F.; MARTINS, J. C. R.; CUNHA, D. A.; BOSCHERO, A. C.; COLLARES-BUZATO, C. B. Histomorphology and ultrastructure of pancreatic islet tissue during in vivo maturation of rat pancreas. **Annals of Anatomy**, v. 188, n. 3, p. 221–234, 2006.

CASTELUCCI, P.; ROBBINS, H. L.; POOLE, D. P.; FURNESS, J. B. The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 117, n. 5, p. 415–22, 2002.

CATCHPOLE, B.; ADAMS, J. P.; HOLDER, A. L.; SHORT, A. D.; OLLIER, W. E. R.; KENNEDY, L. J. Genetics of canine diabetes mellitus: Are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs? **Veterinary Journal**, v. 195, n. 2, p. 139–147, 2013.

CHANG, C. M.; KAO, C. L.; CHANG, Y. L.; YANG, M. J.; CHEN, Y. C.; SUNG, B. L.; TSAI, T. H.; CHAO, K. C.; CHIOU, S. H.; KU, H. H. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 2, p. 414–420, 2007.

CHATZIGEORGIOU, A.; HALAPAS, A.; KALAFATAKIS, K.; KAMPER, E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In Vivo**, v. 258, p. 245–258, 2009.

DAVISON, L. J.; RISTIC, J. M. E.; HERRTAGE, M. E.; RAMSEY, I. K.; CATCHPOLE, B. Anti-insulin antibodies in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 1, p. 53–60, 2003.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O. I.; MELTON, D. A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v. 429, n. 6987, p. 41–6, 6 maio 2004.

ENGERMAN, R. L.; KRAMER, J. W. Dogs with induced or spontaneous diabetes as models for the study of human diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 31, p. 26–29, 1982.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe C: anatomie, histologie, embryologie**, v. 2, n. 1, p. 11–45, mar. 1973.

FARIA, P. F. de. Diabetes mellitus em cães. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. v. 1, p. 8–22, 2007.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. USA: Elsevier, 2004.

FRACASSI, F.; D, P.; CORRADINI, S.; HAFNER, M.; BORETTI, F. S.; SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; REUSCH, C. E. Detemir insulin for the treatment of diabetes mellitus in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 1, p. 73–78, 2015.

GEORGIA, S.; BHUSHAN, A. Beta Cell Replication Is the Primary Mechanism for Maintaining Postnatal Beta Cell Mass. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 7, p. 963–968, 2004.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ: canadian medical association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 175, n. 2, p. 165–70, 2006.

GITTES, G. K. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. **Developmental Biology**, v. 326, n. 1, p. 4–35, 1 fev. 2009.

GONÇALVES, N.; AMBRÓSIO, C.; PIEDRAHITA, J. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: a multispecies perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 2–10, 2014.

GOODGE, K. a; HUTTON, J. C. Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 11, n. 4, p. 235–242, 2000.

GREGGIO, C.; DE FRANCESCHI, F.; FIGUEIREDO-LARSEN, M.; GRAPIN-BOTTON, A. In vitro pancreas organogenesis from dispersed mouse embryonic progenitors. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 89, p. 1–8, jan. 2014.

GUPTA, V.; GARG, K.; RAHEJA, S.; CHOUDHRY, R.; TULI, A. The histogenesis of islets in the human fetal pancreas. **Journal Anatomical Society India**, v. 51, n. 1, p. 23–26, 2002.

GUPTILL, L.; GLICKMAN, L.; GLICKMAN, N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: Analysis of Veterinary Medical Data Base records (1970-1999). **Veterinary Journal**, v. 165, n. 3, p. 240–247, 2003.

HAWKINS, K. L.; SUMMERS, B. A.; KUHAJDA, F. P.; SMITH, C. A. Immunocytochemistry of normal pancreatic islets and spontaneous islet cell tumors in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 2, p. 170–179, 1987.

HERRERA, P. L. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. **Development** (Cambridge, England), v. 127, n. 11, p. 2317–22, jun. 2000.

HUANG, J.; LU, W.; HSU, B. R. Canine islet isolation, cryopreservation, and transplantation to nude mice. **Medical Journal**, v. 26, n. 10, p. 722–728, 2003.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Domestic animal embriology**. 11. ed. [S.I.] Elsevier, 2010.

JUANG, J.-H.; PENG, S.-J.; KUO, C.-H.; TANG, S.-C. Three-dimensional islet graft histology: panoramic imaging of neural plasticity in sympathetic reinnervation of transplanted islets under the kidney capsule. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 5, p. E559–70, 2014.

KAHAN, B. W.; JACOBSON, L. M.; HULLETT, D. A.; OCHOADA, J. M.; OBERLEY, T. D.; LANG, K. M.; ODORICO, J. S. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells. **Diabetes**, v. 52, 2003.

KIM, S. Y.; LEE, S.; HONG, S. W.; MIN, B. H.; LEE, K. U.; BENDAYAN, M.; PARK, I. S. Nestin action during insulin-secreting cell differentiation. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 58, n. 6, p. 567–576, 2010.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. **Veterinary anatomy of domestic animals**. 3rd. ed. Germany: Shcattauher, 2007.

KUIJK, E. W.; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; GEIJSEN, N.; MACKLON, N.; ROELEN, B. A. J. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 2, p. 254–271, 2011.

LEE, J. I.; KIM, H. W.; KIM, J. Y.; BAE, S. J.; JOO, D. J.; HUH, K. H.; FANG, Y. H.; JEONG, J. H.; KIM, M. S.; KIM, Y. S. Microencapsulation of pancreatic islets with canine ear cartilage for immunoisolation. **Transplantation Proceedings**, v. 44, n. 4, p. 1091–1094, 2012.

LIN, H.; CHAN, T.; FU, R.; CHUU, C.; CHIU, S.; TSENG, Y.; LIU, S.; LAI, K.; SHIH, M.; LIN, Z.; CHEN, H.; YEH, D.; LIN, S. Applicability of adipose-derived stem cells in type 1 diabetes mellitus. **Cell Transplantation**, v. 24, p. 521–532, 2015.

LOPEZ, A. D.; KAYALI, A. G.; HAYEK, A.; KING, C. C. Isolation, culture, and imaging of human fetal pancreatic cell clusters. **Journal of Visualized Experiments**, n. 87, p. 1–8, 2014.

LYTTLE, B. M.; LI, J.; KRISHNAMURTHY, M.; FELLOWS, F.; WHEELER, M. B.; GOODYER, C. G.; WANG, R. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1169–1180, 2008.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; BEYER NARDI, N. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 7, p. 150205112613009, 2015.

MATTIN, M.; O'NEILL, D.; CHURCH, D.; MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. An epidemiological study of diabetes mellitus in dogs attending first opinion practice in the UK. **The Veterinary Record**, v. 174, n. 14, p. 349, 2014.

MIKHALSKI, D.; COULIC, V.; BILIBIN, D.; NOVIKOV, V.; DELR??E, P. Back to the reinnervation of the pancreas after transplantation? (Experimental study on dogs, cats, and rats). **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 2010–2018, 2014.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

MORISCOT, C.; FRAIPONT, F. de; RICHARD, M.-J.; MARCHAND, M.; SAVATIER, P.; BOSCO, D.; FAVROT, M.; BENHAMOU, P.-Y. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenviromental manipulation in vitro. **Stem Cells**, v. 23, p. 594–603, 2005.

NELSON, R.; REUSCH, C. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. **The Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. 1–9, 2014.

NIESSEN, S. J. M.; FERNANDEZ-FUENTE, M.; MAHMOUD, A.; CAMPBELL, S. C.; ALDIBBIAT, A.; HUGGINS, C.; BROWN, A. E.; HOLDER, A.; PIERCY, R. J.; CATCHPOLE, B.; SHAW, J. A. M.; CHURCH, D. B. Novel diabetes mellitus treatment: mature canine insulin production by canine striated muscle through gene therapy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, n. 1, p. 16–25, 2012.

OHKURA, S.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. **Endocrinology**. [s.l.]: Academic Presss, 2000.

PÖPPL, Á. G.; GONZÁLEZ, F. H. D. Aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais da Diabetes Mellitus em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 33–40, 2005.

PÖPPL, A. G.; OLIVEIRA, S. T. De; SORTICA, M. S.; FERREIRA, R. R.; BARBOSA, P. R.; LACERDA, L. D. A.; GONZÁLEZ, F. D. Avaliação clínico-laboratorial de uma preparação de insulina suína lenta no controle de cães diabéticos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 125–135, 2006.

RAHMATI, S.; ALIJANI, N.; KADIVAR, M. In vitro generation of glucose-responsive insulin producing cells using lentiviral based pdx-1 gene transduction of mouse (C57BL/6) mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, n. 3, p. 413–419, 2013.

REDECKER, P.; SEIPELT, A.; JORNS, A.; BARGSTEN, G.; GRUBE, D. The microanatomy of canine islets of Langerhans: implications for intra-islet regulation. **Anatomy and Embryology**, v. 185, n. 2, p. 131–141, 1992.

RIJNBEEK, A.; KOOISTRA, H. S. **Clinical endocrinology of dogs and cats**. 2. ed. Germany: Schlütersche, 2010.

RODRIGUEZ-DIAZ, R.; ABDULREDA, M. H.; FORMOSO, A. L.; GANS, I.; RICORDI, C.; BERGGREN, P.; CAICEDO, A. Autonomic Axons in the Human Endocrine Pancreas Show Unique Innervation Patterns. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 45–54, 2012.

SCHLOSSMANN, H. The carbohydrate metabolism of the foetal dog under the influence of insulin. **Journal Physiology**, v. 92, p. 219–227, 1938.

SEABERG, R. M.; SMUKLER, S. R.; KIEFFER, T. J.; ENIKOLOPOV, G.; ASGHAR, Z.; WHEELER, M. B.; KORBUTT, G.; VAN DER KOOY, D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 1115–1124, 2004.

SEEBERGER, K. L.; DUFOUR, J. M.; SHAPIRO, a M.; LAKEY, J. R.; RAJOTTE, R. V.; KORBUTT, G. S. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. **Laboratory Investigation: a journal of technical methods and pathology**, v. 86, n. 2, p. 141–153, 2006.

SHIELDS, E. J.; LAM, C. J.; COX, A. R.; RANKIN, M. M.; VAN WINKLE, T. J.; HESS, R. S.; KUSHNER, J. A. Extreme beta-cell deficiency in pancreata of dogs with canine

diabetes. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e0129809, 2015.

SHIROI, A.; YOSHIKAWA, M.; YOKOTA, H.; FUKUI, H.; ISHIZAKA, S.; TATSUMI, K.; TAKAHASHI, Y. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. **Stem Cells**, v. 20, p. 284–292, 2002.

SKELIN, M.; RUPNIK, M.; CENCIC, A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. **Altex**, v. 27, n. 2, p. 105–113, 2010.
SLACK, J. M. Developmental biology of the pancreas. **Development**, v. 121, n. 6, p. 1569–1580, 1995.

SON, W. C.; FAKI, K.; MOWAT, V.; GOPINATH, C. Spontaneously occurring extra-islet endocrine cell proliferation in the pancreas of young Beagle dogs. **Toxicology Letters**, v. 193, n. 2, p. 179–182, 2010.

SPAGNOLI, F. M. From endoderm to pancreas: a multistep journey. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 64, n. 18, p. 2378–90, set. 2007.

STEINER, D. J.; KIM, A.; MILLER, K.; HARA, M. Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. **Islets**, v. 2, n. 3, 2010.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; ISHIKAWA, S.; MICHISHITA, M.; ARAI, T.; YAMAMOTO, I. Mechanism of insulin production in canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 189, p. 1–6, 2013.

THURÓCZY, J.; MÜLLER, L.; KÓLLAR, E.; BALOGH, L. Development of foetal and alteration of maternal endocrine functions in pregnant dogs. **Internartional Symposium on Canine and Feline Reproduction**, v. 7, p. 29–30, 2012.

TIMPER, K.; SEBOEK, D.; EBERHARDT, M.; LINSCHIED, P.; CHRIST-CRAIN, M.; KELLER, U.; MU, B.; ZULEWSKI, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 1135–1140, 2006.

VÁZQUEZ, P.; ROBLES, A. M.; DE PABLO, F.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, C. Non-neural tyrosine hydroxylase, via modulation of endocrine pancreatic precursors, is required for normal development of beta cells in the mouse pancreas. **Diabetologia**, v. 57, n. 11, p. 2339–2347, 2014.

VOLTARELLI, J. C.; COURI, C. E. B.; RODRIGUES, M. C.; MORAES, D. a.; STRACIERI, A. B. P. L.; PIERONI, F.; NAVARRO, G.; MADEIRA, M. I. a.; SIMÕES, B. P. Terapia celular no diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 55 16, p. 149–156, 2009.

WEI, J. P.; ZHANG, T. S.; KAWA, S.; AIZAWA, T.; OTA, M.; AKAIKE, T.; KATO, K.; KONISHI, I.; NIKAIDO, T. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. **Cell Transplantation**, v. 12, n. 5, p. 545–552, 2003.

WHITE, M. G.; AL-TURAIFI, H. R.; HOLLIMAN, G. N.; ALDIBBIAT, A.; MAHMOUD, A.; SHAW, J. a M. Pluripotency-associated stem cell marker expression in proliferative cell cultures derived from adult human pancreas. **The Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 2, p. 169–76, 2011.

WIECZOREK, G.; POSPISCHIL, A.; PERENTES, E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). **Experimental and Toxicologic Pathology: official journal of the gesellschaft fur toxikologische pathologie**, v. 50, n. 3, p. 151–172, 1998.